

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TIAGO LUCINI

**MONITORAMENTO ELETRÔNICO DAS ATIVIDADES ALIMENTARES DE
PERCEVEJOS PENTATOMÍDEOS EM DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS
POR MEIO DA TÉCNICA DE EPG (*ELECTRICAL PENETRATION GRAPH*)**

CURITIBA

2017

TIAGO LUCINI

**MONITORAMENTO ELETRÔNICO DAS ATIVIDADES ALIMENTARES DE
PERCEVEJOS PENTATOMÍDEOS EM DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS
POR MEIO DA TÉCNICA DE EPG (*ELECTRICAL PENETRATION GRAPH*)**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Antônio Ricardo Panizzi

CURITIBA

2017


TIAGO LUCINI

"MONITORAMENTO ELETRÔNICO DAS ATIVIDADES ALIMENTARES DE
PERCEVEJOS PENTATOMÍDEOS EM DIFERENTES PLANTAS
HOSPEDEIRAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE EPG (ELECTRICAL
PENETRATION GRAPH)"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em
Ciências Biológicas", no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná,
pela Comissão formada pelos professores:




Dr. Antônio Ricardo Panizzi (Orientador)
(Embrapa Trigo - RS)




Dr. Edson Hirose
(Embrapa Arroz e Feijão - Goiânia GO)



Lúcia Massutti de Almeida
(UFPR)



Dr. Paulo Roberto Valle da Silva Pereira
(Embrapa Trigo - RS)



Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva
(UFPR)

Curitiba, 08 de março de 2017.

Aos meus pais, Ari (*In memoriam*) e Salete

Aos meus irmãos Rodrigo e Mauricio

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me propiciar mais uma conquista na minha vida.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de realizar o curso e aos professores do Programa pelo aprendizado, em especial ao Professor Dr. Mário Antônio Navarro da Silva.

Ao Dr. Antônio Ricardo Panizzi pela excelente orientação, pelos ensinamentos profissionais e pessoais e principalmente pela sua amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Centro de Pesquisa em Trigo pela disponibilidade de espaço e infraestrutura para realizar as pesquisas.

A United State Department of Agriculture (USDA), Parlier, Califórnia, em especial o pessoal da entomologia, pelo suporte oferecido durante o período de doutorado sanduíche.

Aos pesquisadores do Laboratório de Entomologia da Embrapa Trigo Dr. Alberto L. Marsáro Jr, Dr. Douglas Lau e o Dr. Paulo R.V.S Pereira pelo apoio, amizade, e momentos de descontração nesses anos de convivência.

A Dr. Elaine Backus do USDA pela excelente recepção que tive em seu laboratório e na sua casa durante o doutorado sanduíche. Por toda a ajuda e ensinamentos que foram fundamentais no treinamento da técnica de EPG, pela grande amizade que ficou e também pelos ensinamentos na língua inglesa.

A meus amigos do USDA Felix Cervantes, Nancy Goodell, Julie Pedraza, Jenny B. Vasquez, Ernesto Duran, Akusha Kaur e Eva Sadal pela ajuda nos trabalhos do laboratório e também na língua inglesa durante minha estadia nos EUA.

Aos colegas e amigos de república Alan Diego da Conceição Santos, Allison Puska, Ana Carolina Sanches, Bárbara Iha, Márcio Tameirão Pinto e Paula Neuburger pela parceria durante minha estadia em Curitiba.

Aos amigos Renata Emy e Harvey Wu pela parceria e amizade durante nossa estadia no dormitório do Kearney em Parlier, Califórnia.

A minha querida amiga e colega Lisonéia F. Smaniotto pela sua ajuda com o EPG, pela grande amizade e companheirismo.

As ex-estagiárias e amigas Alice Agostinetti e Natália Webber pela grande ajuda fornecida nas tarefas do laboratório.

Aos demais amigos e amigas do laboratório: Ana Paula Scarparo, Ana Cláudia Tomé, Bruna Pazinato, Jefferson F. Tomacheski, Júlio C. Minosso, Laura Viana e Vânia Bianchin por toda ajuda e amizade.

Ao pessoal do insetário pela ajuda fornecida nos trabalhos de telado na manutenção das plantas e pelas coletas de percevejos no campo.

A meus familiares que mesmo de longe também fizeram com que este desafio virasse realidade. A minha Mãe Maria S. Lucini pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida, aos meus irmãos Mauricio Lucini e Rodrigo Lucini pelo apoio. E claro uma pessoa muito especial a qual eu gostaria de agradecer profundamente, mas que não está mais aqui, meu querido Pai Ari Lucini que sempre lutou e esteve ao meu lado dando seu melhor para que eu estudasse e alcançasse meus objetivos. Infelizmente o senhor não está aqui para ver mais essa vitória na qual o senhor também faz parte, mas sei que lá de cima o senhor está dando aquela risada sincera de felicidade.

Enfim, a todos aqueles que não foram citados, mas que de alguma maneira me auxiliaram na finalização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

MONITORAMENTO ELETRÔNICO DAS ATIVIDADES ALIMENTARES DE PERCEVEJOS PENTATOMÍDEOS EM DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS POR MEIO DA TÉCNICA DE EPG (*ELECTRICAL PENETRATION GRAPH*)

O comportamento alimentar de cinco espécies de percevejos pentatomídeos foi caracterizado em diferentes plantas hospedeiras por meio da técnica de EPG (*Electrical Penetration Graph*). Estudos histológicos foram realizados para correlacionar as ondas elétricas com seus locais de penetração. Os percevejos (Pentatomidae) são insetos robustos e ativos, e isso dificulta a sua fixação ao eletrodo em estudos com EPG. Além disso, os lipídios cuticulares podem reduzir a eficácia da fixação. Foi observado que a remoção dos lipídios cuticulares via raspagem da cutícula com uma lixa melhorou a fixação do eletrodo ao longo do tempo. O comportamento do percevejo parece ser mais importante para o sucesso da fixação do que o peso corporal. O comportamento alimentar dos percevejos avaliados foi dividido em dois tipos de atividades: de não-alimentação e de alimentação. O primeiro é representado pelas seguintes atividades: parado, movendo-se, tocando a superfície da planta com o rostro (labium) e oviposição. A segunda representa todas as atividades registradas após a inserção dos estiletes no tecido vegetal. *E. meditabunda* (F.) em haste de soja gerou seis diferentes formas de onda de alimentação agrupadas em quatro fases: inserção e penetração dos estiletes (onda Em1), onda X, ingestão (Em2 e Em3) e interrupção (Em4 e Em5). *Piezodorus guildinii* (Westwood), alimentando-se em plantas de soja, produziu oito ondas de alimentação, as quais foram agrupadas em três fases: inserção e penetração dos estiletes (ondas Pg1a, Pg1b, Pg1c e Pg1d), ingestão (Pg2, Pg3a e Pg3b), e interrupção (onda Pg4). *Dichelops melacanthus* (Dallas) em colmo de plântulas de milho produziu quatro ondas de alimentação agrupadas em duas fases: inserção e penetração dos estiletes (onda Dm1) e ingestão (Dm2, Dm3a e Dm3b). *Dichelops furcatus* (F.) em plantas de trigo produziu sete ondas de alimentação agrupadas em duas fases: inserção e penetração dos estiletes (ondas Df1a e Df1b) e ingestão (Df2, Df3a, Df3b, Df4a e Df4b). *Bagrada hilaris* (Burmeister) alimentando-se em folhas de couve chinesa produziu duas ondas de alimentação agrupadas em uma única fase: ingestão (ondas Bh1 e Bh2). Para todas as espécies, a fase de inserção e penetração dos estiletes representou o movimento profundo dos estiletes nos tecidos e a secreção da bainha salivar, assim como a fase de interrupção que representou breves interrupções durante a ingestão no xilema e/ou floema. *E. meditabunda* ingeriu seiva do xilema (onda Em2) e do floema (Em3) na haste de soja. A ingestão do floema foi sempre precedida por uma onda X (representa o primeiro contato com os vasos do floema). *E. meditabunda* repetiu os eventos de ingestão (xilema e floema) mais de 4X por percevejo durante as 8 horas de gravação, com uma duração média de 50 min por evento. *P. guildinii* ingeriu seiva do xilema em folíolo, haste e vagem de soja (onda Pg2). Em vagens (endosperma da semente), seus estiletes também se moveram durante uma forma de onda (Pg3a) para romper as células (ruptura celular), e permaneceram imóveis em outra (Pg3b), a qual representa a ingestão. *P. guildinii* alimentando-se da haste de soja

repetiu cada evento de ingestão 1,2X por percevejo por cerca de 40 min por evento. No endosperma da semente, alimentou-se durante cerca de 80 min por evento, cada evento repetido 0,5X por percevejo. *D. melacanthus* ingeriu seiva do xilema em colmo de milho (onda Dm2). Em outra forma de onda (Dm3a) seus estiletes moveram-se dentro do tecido vegetal (ruptura celular), mas estavam imóveis em outra (Dm3b), que representou ingestão. *D. melacanthus* repetiu cada evento de alimentação (xilema e ruptura celular) mais de 3X por percevejo por cerca de 24 min por evento. *D. melacanthus* quando alimentado com plântulas de milho, expeliu mais excretas (9,9 gotas por percevejo) e também maior quantidade de saliva e/ou alimento líquido regurgitado do que quando se alimentou de sementes de soja (1,4 gotas por percevejo). *B. hiliaris* usa apenas a alimentação via ruptura celular em folha de couve chinesa, onde na onda Bh1 os estiletes moveram-se dentro do tecido foliar (ruptura celular), e a onda Bh2 provavelmente representou a atividade de ingestão. Independentemente do sinal aplicado (AC [corrente alternada] ou DC [corrente contínua]) e nível de impedância (10^7 ou 10^9 Ohms), *B. hiliaris* passou a maior parte do tempo em atividades de não alimentação (87%) e apenas 13% em atividades alimentares. Alta voltagem associada com diferentes sinais elétricos e impedâncias de entrada foram mais perturbadores durante as atividades de não-alimentação do que em atividades de alimentação do percevejo *B. hiliaris*. Estudos com EPG revelaram que uma ou até duas estratégias de alimentação diferentes são empregadas por um mesmo percevejo pentatomídeo, dependendo da espécie de percevejo e do sítio de alimentação explorado.

Palavras chaves: Heteroptera, Pentatomidae, comportamento alimentar, monitor de alimentação eletrônica, gráfico de penetração elétrica, eletropenetrografia, metodologia de fixação de insetos

ABSTRACT

FEEDING BEHAVIOR MONITORING OF THE STINK BUGS OF THE FAMILY PENTATOMIDAE ON DIFFERENT HOST PLANTS USING THE EPG TECHNIQUE (*ELECTRICAL PENETRATION GRAPH*)

The feeding behavior of five different species of pentatomids were characterized on different host plants via electronic monitoring using the EPG (*Electrical Penetration Graph*) technique. Histological studies were done to correlated specific waveforms with their penetration sites. Stink bugs (Pentatomidae) are robust and restless insects, making them difficult to wire for electropenetrography (EPG) studies. Moreover, cuticular lipids may reduce wire effectiveness. Results indicated that removal of cuticular lipids by sanding greatly improved attachment of the gold wire over time. Behavior appears to be more important for successful wiring than body weight. For all stink bug species evaluated the non-probing phase was represented by the following activities: standing still, walking, touching the plant surface with rostrum (labium), and egg deposition. Whereas, probing waveforms represented all activities recorded after the insertion of stylets into plant tissue. EPG of *E. meditabunda* on soybean stems generated six probing waveforms grouped into four phases: pathway (wave Em1), X-wave, ingestion (Em2 and Em3), and interruption (Em4 and Em5). For *Piezodorus guildinii* (Westwood) feeding on soybean plants, eight probing waveforms were recorded and grouped into three phases: pathway (waves Pg1a, Pg1b, Pg1c, and Pg1d), ingestion (Pg2, Pg3a, and Pg3b), and interruption (Pg4). *Dichelops melacanthus* (Dallas) on stem of maize seedlings produced four probing waveforms grouped into two phases: pathway (wave Dm1), and ingestion (Dm2, Dm3a and Dm3b). *Dichelops furcatus* (F.) on wheat plants produced seven probing waveforms grouped into two phases: pathway (waves Df1a and Df1b), and ingestion (Df2, Df3a, Df3b, Df4a and Df4b). *Bagrada hilaris* (Burmeister) feeding on leaves of Napa cabbage produced two probing waveforms grouped in one phase: ingestion (Bh1 and Bh2). For all species, pathway phase represented deep stylet penetration e secretion of salivary sheath, as well as, interruption phase which represented brief interruptions during xylem/phloem ingestion. *E. meditabunda* ingested xylem (wave Em2) and phloem sap (Em3) on soybean stem, and phloem ingestion was always preceded by an X-wave (first contact with phloem vessels). *E. meditabunda* repeated ingestion (xylem and phloem) over 4X/bug during the 8-hours of recording for ca. 50 minutes/event. *P. guildinii* ingested xylem sap on soybean leaves, stems, and pods (Pg2); and on pods (seed endosperm), its stylets also moved/lacerated during one waveform (Pg3a – cell rupture), but were motionless in another (Pg3b), which represented ingestion. *P. guildinii* feeding on soybean stem repeated each ingestion 1.2X/bug for ca. 40 minutes/event. On seed endosperm, it fed for ca. 80 minutes/event, each event repeated only 0.5X/bug. *D. melacanthus* ingested xylem sap on maize stems (Dm2); in other waveform (Dm3a) its stylets moved/lacerated inside tissue (cell rupture), but were motionless in another (Dm3b), which represented ingestion. *D. melacanthus* repeated each feeding event (xylem and cell rupture) over 3X/bug for ca. 24 minutes/event. *D. melacanthus* feeding on

maize seedling excreted more drops (9.9 drops/bug) and also larger amount of saliva/regurgitate liquid food than when feeding on soybean seed (1.4 drops/bug). *B. hilaris* uses only cell rupture feeding, where in waveform Bh1 the stylets moved/lacerated inside the leaf tissue (cell rupture), and waveform Bh2 probably represented ingestion. Independently of the signal (AC [alternating current] or DC [direct current]) and Ri level (10^7 or 10^9 Ohms) applied, *B. hilaris* spent most of the time in non-probing activities (87%), and only 13% in probing activities. High voltage associated with variable signals and input impedances were more disturbing during non-probing activities than during probing activities. EPG studies revealed that one or two different feeding strategies are used by a same pentatomid, depending upon species and feeding site exploited.

Key words: Heteroptera, Pentatomidae, feeding behavior, electronic feeding monitor, electrical penetration graph, electropenetrography, insect wiring methodology

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 - Monitores de epg utilizados na determinação do comportamento alimentar de insetos sugadores. monitor “EPG-DC” modelo Giga 8 desenvolvido por Fred Tjallingii (A). monitor universal “EPG AC-DC” desenvolvido por Backus & Bennett (B). 36
- Figura 2 - Diagrama ilustrativo do sistema de monitoramento eletrônico para estudos do comportamento alimentar de insetos sugadores. 38
- Figura 3 - Detalhe do amplificador e do eletrodo do inseto, o qual é colado a um fio de ouro e esse é colado no corpo do inseto por meio de uma gota de cola de prata condutiva (seta vermelha no detalhe), e em seguida é conectado no EPG probe (amplificador). 39
- Figura 4 - Formas de onda gravadas durante as atividades alimentares de pulgões. 40
- Figura 5 - Bainhas salivares de *Diaphorina citri* Kuwayama na nervura central de folhas de laranja doce. Bainha salivar terminando no tecido do parênquima durante uma forma de onda relacionada com a inserção e penetração dos estiletes (A). Bainha salivar bifurcada terminando no floema durante uma forma de onda relacionada com ingestão nesse vaso condutor (B). 42
- Figura 6 - Posição dos estiletes seccionados de *Nilaparvata lugens* Stål em colmos de plantas de arroz durante formas de onda específicas. Estiletes posicionados no tecido parenquimático durante a penetração dos estiletes (A). Estiletes posicionados no vaso do xilema durante a forma de onda de ingestão (B). 42

CAPÍTULO II

Figura 1 - Método de criação dos percevejos pentatomídeos, nesse caso *Piezodorus guildinii*, no laboratório de entomologia. Potes plásticos utilizados para criação dos adultos e obtenção de ovos (A). Mistura de alimentos utilizados para criação de percevejos em laboratório (B). Detalhe das posturas em barbante (C). Posturas retiradas e colocadas em caixas gerbox para eclosão e desenvolvimento das ninfas (D). Ninfas em desenvolvimento (E). 56

Figura 2 - Metodologia para fixação do fio de ouro no corpo do percevejo. Fêmea imobilizada, no topo de uma tampa de placa de petri, utilizando uma fita adesiva (A). Detalhe do eletrodo do inseto, fixado no bloco de isopor, contendo o filamento de fio de ouro com um pequeno “looping” na extremidade (B). Gota de cola de prata depositada no pronoto do percevejo e o fio de ouro mergulhado na cola (C). Percevejo suspenso no ar após o período de secagem da cola, e detalhe da fixação do fio de ouro no corpo do percevejo (D). 57

Figura 3 - Detalhe do pronoto de uma fêmea adulta de *Piezodorus guildinii* após ser submetido ao processo de raspagem, ou seja, lixado (A) (linha pontilhada delimita a região lixada). Detalhe do pronoto sem a raspagem (B). 58

Figura 4 - Detalhe do experimento com fêmeas adultas de *Loxa deducta* mantidas em duas situações distintas para avaliação do seu comportamento. Percevejo preso ao fio de ouro e mantido pendurado no ar durante o período de avaliação (A). Percevejo preso ao fio de ouro e colocado sobre o alimento (uma vagem de feijão verde) durante o período de avaliação (B). 59

Figura 5 - Detalhe do experimento com fêmeas adultas de *Loxa deducta* mantidas em duas situações distintas para avaliação do seu comportamento. Fêmea adulta livre (não presa ao fio de ouro) e mantida individualmente em uma arena (placa de petri com 15 centímetros de diâmetro) forrada com papel filtro (A). Fêmea adulta presa ao fio de ouro e mantida individualmente em uma arena (placa de petri com 15 centímetros de diâmetro) forrada com papel filtro (B). 60

Figura 6 - Efeito da raspagem do pronoto vs. pronoto não lixado de espécies de percevejos pentatomídeos mantidos em uma vagem de feijão, sobre o número (percentagem) de

indivíduos presos no fio de ouro ao longo do tempo. *Piezodorus guildinii* (A). *Nezara viridula* (B). *Loxa deducta* (C). 63

Figura 7 - Comportamento de fêmeas adultas livres (não presas no fio de ouro) de *Piezodorus guildinii* (PG), *Nezara viridula* (NV) e *Loxa deducta* (LD), ao longo do tempo, mantidas em uma arena com 15 cm de diâmetro forrada com papel filtro. Número de movimentos de um determinado ponto para outro (A). Número de giros em torno do seu próprio eixo (360°) (B). Distância total percorrida (C). 66

Figura 8 - Comportamento de fêmeas adultas de *Piezodorus guildinii* (PG), *Nezara viridula* (NV) e *Loxa deducta* (LD) presas no fio de ouro ao longo do tempo, e mantidas em uma arena com 15 cm de diâmetro forrada com papel filtro. Número de movimentos de um determinado ponto para outro (A). Número de giros em torno do seu próprio eixo (360°) (B). Número de trações no fio de ouro (C)..... 68

CAPÍTULO III

Figura 1 - Fêmea de *Edessa meditabunda* presa no fio de ouro e posicionada sobre a haste de uma plântula de soja. Prego de cobre, contendo o fio de cobre + fio de ouro, inserido no EPG *probe* (amplificador) e o eletrodo da planta inserido no solo contendo a planta de soja (estádio V1 [folha unifoliada]), fechando o circuito elétrico. 76

Figura 2 - Metodologia para preparação dos cortes histológicos obtidos de hastes de soja (A). Lâmina semipermanente após o preparo (B)..... 78

Figura 3 - Gráfico de penetração elétrica (EPG-DC), de fêmeas adultas de *Edessa meditabunda* sobre hastes de plântulas de soja, mostrando as formas de onda Z (parado) e Np (caminhando sobre/ou tocando a superfície da planta com o rostro). Caixa expandida mostra a forma de onda Z..... 82

Figura 4 - Formas de onda (EPG-DC) gravadas durante o comportamento alimentar de fêmeas adultas de *Edessa meditabunda* em hastes de plântulas de soja. Visão geral de duas atividades alimentares distintas (290 min), a qual mostra atividades de não alimentação (Np e Z),

inserção e penetração dos estiletes (Em1), ingestão de seiva dos vasos do xilema (Em2), a onda X, e ingestão de seiva dos vasos do floema (Em3) (A). Visualizações expandidas da forma de onda Em1 (B, C). Visualização expandida do momento que o percevejo retira os estiletes do tecido vegetal no final de sua atividade alimentar (D). Forma de onda Em1 e início da onda X (E). Visualização expandida da forma de onda Em2 (F-H). Interrupção (forma de onda Em4) durante a forma de onda Em2 (F). Definição de onda e pico (G). Detalhe de picos mais largos observados durante a forma de onda Em2 (H). Visualizações expandidas da forma de onda Em3 (I-K). Visualização expandida da forma de onda Em3 intercalada com interrupções (forma de onda Em5) (K)..... 83

Figura 5 - Formas de onda X e Em3 gravadas durante as atividades alimentares de fêmeas adultas de *Edessa meditabunda* nos tecidos do floema de hastes de plântulas de soja (A). Expansão da forma de onda X mostrando um aumento gradual do nível de voltagem (B). Transição da forma de onda X para a forma de onda Em3 (ingestão de seiva do floema), a qual mostra uma breve e abrupta queda de voltagem (C). Expansões da forma de onda Em3, mostrando a evolução na aparência ao longo do tempo (D-F)..... 85

Figura 6 - Secções histológicas de hastes de plântulas de soja contendo estiletes e bainha salivar de fêmeas adultas de *Edessa meditabunda*. Bainha salivar secretada durante a penetração dos estiletes e terminando no sítio de ingestão - xilema (A). Ponta dos estiletes terminando no tecido do parênquima durante a forma de onda Em1 (B). Detalhe da ponta dos estiletes nos tecidos do xilema durante a forma de onda Em2 (C). Detalhe da ponta dos estiletes e da bainha salivar nos vasos do floema durante a forma de onda Em3 (D). 87

Figura 7 - Exsudação de conteúdo celular para o meio externo via estiletes decepados de *Edessa meditabunda* após terem sido cortados durante a ingestão de células do floema (forma de onda Em3)..... 88

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Plantas de soja semeadas em copos plásticos descartáveis (100 ml) (A, B) e em vasos plásticos (5L) (C) mantidos em casa de vegetação. 101

Figura 2 - Fêmeas adultas de *Piezodorus guildinii* presas ao fio de ouro durante a gravação de seu comportamento alimentar em estruturas vegetativas de soja: folíolo (A) e haste (B) e em estrutura reprodutiva: vagem de soja (C). 102

Figura 3 - Formas de onda geradas usando EPG AC-DC (impedância de entrada de 10^7 Ohms) gravadas durante as atividades alimentares de fêmeas adultas de *Piezodorus guildinii* em folíolo, haste e vagem de soja. Visão geral do comportamento alimentar em folíolo de soja (~53 min) (A). Detalhes das formas de onda Pg1a, Pg1b, Pg1c e Pg1d (B, C, D, E,) respectivamente). Transição entre as formas de onda Pg1 e Pg2 (F). Detalhe da forma de onda R mostrando o momento em que o percevejo toca a superfície da planta antes de iniciar a inserção dos estiletes (forma de onda Pg1a) (G). 108

Figura 4 - Formas de onda geradas usando EPG AC-DC (impedância de entrada de 10^7 Ohms) gravadas durante as atividades alimentares de *Piezodorus guildinii* em vagem de soja (endosperma da semente). Visão geral do comportamento alimentar de uma sessão alimentar (~80 min) (A). Visão expandida mostrando a sequência de eventos, formas de onda Pg1a → Pg1b → Pg1d → Pg3, e detalhes da forma de onda Pg1d (B). Detalhe do pico observado durante os estádios iniciais da forma de onda Pg1d (C). Estádio médio da forma de onda Pg1d (D). Padrão de transição antes do início da forma de onda Pg3 (E, F). 110

Figura 5 - Detalhe da forma de onda Pg2 gravada durante o comportamento alimentar de *Piezodorus guildinii* em folíolo (A, B), haste (C, D) e vagem (E, F) de soja (impedância de entrada de 10^7 Ohms). Definição de onda e pico na figura B. 112

Figura 6 - Comparação da forma de onda Pg2 (estável) gravada durante o comportamento alimentar de adultos de *Piezodorus guildinii* em quatro diferentes níveis de impedâncias (10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 Ohms) aplicado no folíolo (A, C, E, G) e na haste (B, D, F, H) de plantas de soja. 113

Figura 7 - Detalhe das formas de onda Pg3a (dilaceramento/ maceramento celular) e Pg3b (ingestão) gravadas durante as atividades alimentares de *Piezodorus guildinii* em vagem de soja (endosperma da semente) usando EPG AC-DC (impedância de entrada de 10^7 Ohms) (A, B). 114

Figura 8 - Comparação das formas de onda Pg3a e Pg3b (estáveis) gravadas durante o comportamento alimentar de adultos de *Piezodorus guildinii* em quatro diferentes níveis de impedância (10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 Ohms) aplicado na vagem de soja. 115

Figura 9 - Detalhe das interrupções (setas) denominada forma de onda Pg4, observadas durante a forma de onda Pg2 (ingestão no xilema) (A, B)..... 116

Figura 10 - Secções histológicas de plantas de soja contendo estiletes e bainhas salivares de *Piezodorus guildinii* em haste e vagem de soja. Bainha salivar terminando no tecido do parênquima de haste de soja durante a forma de onda Pg1b (A). Ponta dos estiletes e da bainha salivar no tecido do parênquima de haste de soja, próximo às células do xilema, durante a forma de onda Pg1c (B). Ponta dos estiletes e/ou bainha salivar terminando nos vasos do xilema durante a forma de onda Pg2 gravada em haste de soja (C, D - corte longitudinal em D). Ponta dos estiletes nos vasos do xilema durante a forma de onda Pg2, gravada durante alimentação do percevejo na parede da vagem de soja (E). Secção da vagem de soja mostrando o dano no endosperma da semente próximo ao ponto de inserção dos estiletes, após a gravação da forma de onda Pg3 (F). 117

CAPÍTULO V

Figura 1 - Plântulas de milho semeadas de forma escalonada em copos plásticos descartáveis (100 ml) e mantidos em casa de vegetação. 130

Figura 2 - Detalhe do circuito elétrico e do percevejo pentatomídeo *Dichelops melacanthus* durante a gravação de suas atividades alimentares. Plântula de milho (estádio V2-V3) conectado ao circuito elétrico por meio do eletrodo da planta e o amplificador, no qual o percevejo é conectado ao circuito (A). Fêmea adulta de *D. melacanthus* presa no fio de ouro durante a gravação de seu comportamento alimentar no colmo de plântula de milho (B). ... 131

Figura 3 - Forma de onda “O” gravada para o percevejo *Dichelops melacanthus* sobre o colmo da plântula de milho aplicando um Ri de 10^6 Ohms. Múltiplas ondas “O”, intercaladas com ondas “Z”, a qual representa a postura de ovos por fêmeas de *D. melacanthus* no colmo

de milho (A). Detalhe de uma única onda “O” (B). Detalhe dos ovos ovipositados no colmo de milho durante a gravação de EPG (C)..... 136

Figura 4 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares do percevejo *Dichelops melacanthus* em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Visualização comprimida de um evento de alimentação (~18 min) mostrando a onda de não alimentação Z (percevejo parado) e as ondas de alimentação Dm1 (inserção e penetração dos estiletes) e Dm2 (ingestão de seiva do xilema) (A). Visualização expandida da forma de onda Dm1 (B). Visualização expandida da forma de onda Dm2, e em D é definido a porção dos picos e das ondas (C, D)..... 137

Figura 5 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares do percevejo *Dichelops melacanthus* em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Visualização comprimida de um evento de alimentação (~21 min) mostrando a onda de não alimentação Z (percevejo parado) e ondas de alimentação Dm1 (inserção e penetração dos estiletes) e Dm3 (atividades de dilaceramento/ maceramento e ingestão) (A). Visualização expandida da forma de onda Dm1 e início da forma de onda Dm3 (B). Visualização expandida da forma de onda Dm3a (C, D). Detalhe das formas de onda Dm3a e Dm3b (E). Visualização expandida da forma de onda Dm3b (F). 138

Figura 6 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares do percevejo *Dichelops melacanthus* em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) aplicando um Ri de 10^9 Ohms. Visualização comprimida de eventos de alimentação (~32 min) mostrando as ondas de não alimentação Z e Np (percevejo parado e movendo-se, respectivamente), e dois eventos da onda Dm1 (inserção e penetração dos estiletes) e um evento da onda Dm2 (ingestão de seiva do xilema) (A). Visualização expandida da forma de onda Dm1 (B). Visualização expandida da forma de onda Dm1 e início da forma de onda Dm2 (C). Visualização expandida da forma de onda Dm2 (D, E). 139

Figura 7 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares do percevejo *Dichelops melacanthus* em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) aplicando um Ri de 10^9 Ohms. Visualização comprimida de um evento de alimentação (~31 min) mostrando as ondas de não alimentação Z e Np (percevejo parado e movendo-se, respectivamente) e as ondas de alimentação Dm1 (inserção e penetração dos estiletes) e Dm3

(atividades de dilaceramento/ maceramento) (A). Visualização expandida da forma de onda Dm1 e início da forma de onda Dm3 (B). Visualização expandida da forma de onda Dm3a (C, D). Detalhe das formas de onda Dm3a e Dm3b (E). Visualização expandida da forma de onda Dm3b (F). 140

Figura 8 - Forma de onda Dm2 de *Dichelops melacanthus* gravada em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) em quatro diferentes níveis de impedância de entrada (Ri). A = 10^7 , B = 10^8 , C = 10^9 , D = 10^{10} Ohms. 142

Figura 9 - Forma de onda Dm3a de *Dichelops melacanthus* gravada em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) em quatro diferentes níveis de impedância de entrada (Ri). A = 10^7 , B = 10^8 , C = 10^9 , D = 10^{10} Ohms..... 143

Figura 10 - Cortes histológicos de colmos de plântulas de milho contendo estiletes seccionados e bainhas salivares do percevejo *Dichelops melacanthus*. Bainha salivar terminando no tecido do parênquima durante a forma de onda Dm1 (A). Ponta da bainha salivar e dos estiletes terminando nas células dos vasos do xilema durante a forma de onda Dm2 (B). Ponta dos estiletes em células do parênquima durante a forma de onda Dm3a (C). Secreção da flange (externamente no colmo) e de uma bainha salivar incompleta (internamente no tecido) durante a forma de onda Dm3a (D). Secção de um colmo fresco de milho contendo estiletes seccionados e mostrando a área com dano visível no tecido vegetal (região de coloração esbranquiçada circundada pela linha vermelha) após a gravação de um evento da onda Dm3 (E)..... 145

Figura 11 - Progressão dos danos (setas) provocados pelas atividades alimentares de um único percevejo *Dichelops melacanthus* mantido no colmo de plântula de milho (estádio V1) por um período de 8 horas. 150

CAPÍTULO VI

Figura 1 - Plantio escalonado de trigo em copos plásticos descartáveis (100 ml) (A) e em vasos plásticos (2L) (B) mantidos em casa de vegetação..... 157

Figura 2 - Fêmeas adultas de *Dichelops furcatus* presas no fio de ouro durante a gravação de seu comportamento alimentar em estrutura vegetativa de trigo: colmo (estádio V3 - perfilhamento) (A) e em estrutura reprodutiva: espiga de trigo (estádio R11.1 - fase de grão leitoso) (B)..... 158

Figura 3 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em colmo de plântulas de trigo durante o período vegetativo (estádio V3 - perfilhamento) aplicando um Ri de 10^7 Ohms (A-C) e 10^9 Ohms (D-F). Visualização comprimida de um evento de alimentar (~40 min) mostrando as formas de onda Df1a (inserção e penetração dos estiletes) e Df2 (ingestão de seiva do xilema) (A). Visualização expandida da forma de onda Df1a (B). Visualização expandida da forma de onda Df2 e definição da porção dos picos e das ondas (C). Visualização comprimida de um evento de alimentação (~35 min) mostrando as formas de onda Df1a e Df2 (D). Visualização expandida da forma de onda Df1a e início da onda Df2 (E). Visualização expandida da forma de onda Df2 (F)..... 163

Figura 4 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em espigas de trigo durante o período reprodutivo (estádio R11.1 – grão leitoso) aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Visualização comprimida de um evento alimentar (~50 min) mostrando as formas de onda Df1 (inserção e penetração dos estiletes) e Df2 (ingestão de seiva do xilema) (A). Visualização expandida de ambos os subtipos da forma de onda Df1 - Df1a e Df1b (B). Detalhe dos subtipos Df1a e Df1b (C). Visualização expandida da forma de onda Df2 (D). 165

Figura 5 - Forma de onda Df3 gravada usando epg ac-dc durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em colmo de plântula de trigo durante o período vegetativo (estádio V3 - perfilhamento) aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Visualização comprimida de um evento alimentar (~60 min) mostrando as ondas Df1a (inserção e penetração dos estiletes) e Df3 (atividades de dilaceramento/ maceramento e ingestão) (A). Visualização expandida da forma de onda Df1a e início da forma de onda Df3a (B). Visualização expandida da forma de onda Df3a (C). Detalhe das formas de onda Df3a e Df3b (D). Visualização expandida da forma de onda Df3b (E). 166

Figura 6 - Forma de onda Df3 gravada usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em colmo de plântula de trigo durante o período vegetativo (estádio V3 - perfilhamento) aplicando um Ri de 10^9 Ohms. Visualização comprimida de um evento alimentar (~50 min) mostrando as formas de onda Df1a (inserção e penetração dos estiletes) e Df3 (atividades de dilaceramento/ maceramento e ingestão) (A). Visualização expandida da forma de onda Df1a e início da forma de onda Df3a (B). Visualização expandida da forma de onda Df3a (C). Detalhe das formas de onda Df3a e Df3b (D). Visualização expandida da forma de onda Df3b (E, F). 168

Figura 7 - Forma de onda Df4 gravada usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em espiga de trigo durante o período reprodutivo (estádio R11.1 – grão leitoso) aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Visualização comprimida de um evento alimentar (~140 min) mostrando as formas de onda Df1 (inserção e penetração dos estiletes) e Df4 (atividades de dilaceramento/ maceramento e ingestão) (A). Visualização expandida da forma de onda Df4a (B). Visualização expandida mostrando os detalhes dos subtipos Df4a e Df4b (C). Visualização expandida da forma de onda Df4b (D). 170

Figura 8 - Forma de onda Df4 gravada usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em espiga de trigo durante o período reprodutivo (estádio R11.1 – grão leitoso) aplicando um Ri de 10^9 Ohms. Visualização comprimida de um evento alimentar (~60 min) mostrando as formas de onda Df1 (inserção e penetração dos estiletes) e Df4 (atividades de dilaceramento/ maceramento e ingestão) (A). Visualização expandida da forma de onda Df4a (B). Visualização expandida mostrando os detalhes dos subtipos Df4a e Df4b (C). Visualização expandida da forma de onda Df4b (D). 171

Figura 9 - Cortes histológicos de colmos de trigo (estádio V8) e estruturas da espiga de trigo (estádio R11.1) contendo estiletes seccionados e bainhas salivares do percevejo *Dichelops furcatus*. Bainha salivar terminando no tecido do parênquima durante a forma de onda Df1a no colmo (A). Ponta da bainha salivar e dos estiletes terminando nos vasos do xilema durante a forma de onda Df2 no colmo (B). Ponta dos estiletes próximo dos vasos do xilema durante a forma de onda Df2 na espiga de trigo (camada da lema) (C). Ponta dos estiletes em células do parênquima durante a forma de onda Df3a no colmo (D). Secreção da flange (externamente na colmo) e de uma bainha salivar incompleta (internamente no tecido) durante a onda Df3a (E).

Ponta dos estiletes internamente no endosperma da semente durante a forma de onda Df4a e uma bainha salivar incompleta (indica pela seta vermelha no detalhe) secretada internamente no tecido (F). 173

Figura 10 - Corte do colmo fresco (estádio V8) e semente (estádio R11.1) imatura de trigo contendo os estiletes seccionados do percevejo *Dichelops furcatus*. Secção do colmo fresco de trigo contendo estiletes seccionados e mostrando a área com dano visível (região de coloração esbranquiçada circundada pela linha vermelha) após a gravação de um evento da onda Df3 (A). Semente imatura de trigo contendo estiletes seccionados e a flange depositada externamente sobre a camada da lema durante a forma de onda Df4 (B). Secção de uma semente fresca de trigo mostrando a área sem danos (seta preta) e área danificada (região de coloração esbranquiçada indicada pela seta vermelha) após a gravação de um evento da onda Df4 (C). 174

Figura 11 - Danos (setas) provocados pelas atividades alimentares, via ruptura celular, do percevejo *Dichelops furcatus* mantido no colmo de plântulas de trigo (estádio V3) por um período de 8 horas. Danos em diferentes regiões da folha central (A). Morte da folha central “coração morto” (B)..... 179

CAPÍTULO VII

Figura 1 - Caixas plásticas (arenas) revestidas com papel sensível à água (cartão amarelo) utilizadas no experimento. Semente de soja túrgida em água (A), e plântula de milho (estádio V2) mantida em algodão umedecido em água dentro de uma tampa plástica isolada do papel hidrosensível (B)..... 187

Figura 2 - Média (\pm EP) do número de eventos das formas de onda relacionadas com alimentação realizada por cada inseto (NWEI) registrado por meio da técnica de EPG durante as atividades alimentares de três espécies de pentatomídeos (Pg = *Piezodorus guildinii*; Dm = *Dichelops melacanthus*; e Em = *Edessa meditabunda*), em estrutura vegetativa (haste/colmo) e reprodutiva (semente) de diferentes plantas. *P. guildinii* alimentando-se em haste de soja (n = 25) e vagem de soja (endosperma da semente) (n = 17), *E. meditabunda* em haste de soja (n = 25), e *D. melacanthus* no colmo de plântulas de milho (n = 21)..... 189

Figura 3 - Média (\pm EP) da duração das formas de onda relacionadas com alimentação por inseto (WDI) (minutos) registrado por meio da técnica de EPG durante as atividades alimentares de três espécies de pentatomídeos (Pg = *Piezodorus guildinii*; Dm = *Dichelops melacanthus*; e Em = *Edessa meditabunda*), em estrutura vegetativa (haste/colmo) e reprodutiva (semente) de diferentes plantas. *P. guildinii* alimentando-se em haste de soja (n = 25) e vagem de soja (endosperma da semente) (n = 17), *E. meditabunda* em haste de soja (n = 25), e *D. melacanthus* no colmo de plântulas de milho (n = 21)..... 190

Figura 4 - Média (\pm EP) da duração dos eventos das formas de onda relacionadas com alimentação por inseto (WDEI) (minutos) registrado por meio da técnica de EPG durante as atividades alimentares de três espécies de pentatomídeos (Pg = *Piezodorus guildinii*; Dm = *Dichelops melacanthus*; e Em = *Edessa meditabunda*), em estrutura vegetativa (haste/colmo) e reprodutiva (semente) de diferentes plantas. *P. guildinii* alimentando-se em haste de soja (n = 25) e vagem de soja (endosperma da semente) (n = 17), *E. meditabunda* em haste de soja (n = 25), e *D. melacanthus* no colmo de plântulas de milho (n = 21)..... 191

Figura 5 - Média (\pm EP) do número de gotas, número de gotas <1,5 mm, número de gotas >2,0 mm, e a área de gotas de fezes líquidas excretadas por *Dichelops melacanthus* ao se alimentar de sementes de soja túrgidas e plântulas de milho. 192

Figura 6 - Fezes excretadas (manchas redondas) e saliva e/ou alimento líquido regurgitado (marcas) expelidos no papel hidrosensível produzidos por adultos de *Dichelops melacanthus* ao se alimentarem de plântulas de milho (A, C) e de sementes de soja túrgidas (B, D). 193

Figura 7 - Gota de saliva possivelmente contendo alimento líquido regurgitado (área circundada) posicionada na ponta dos estiletes de *dichelops furcatus* após a alimentação em folhas de trigo. 196

CAPÍTULO VIII

Figura 1 - Casal do percevejo pentatomídeo *Bagrada hilaris* coletado no campo experimental da Universidade da Califórnia (A). Colônia do percevejo em folhas de couve mantidas no laboratório (B). 202

Figura 2 - Detalhe da fêmea de *Bagrada hilaris* presa no fio de ouro e esse inserido no EPG *probe* (amplificador). Fêmea posicionada sobre a folha de couve chinesa presa por meio de tiras de parafilm e mantida com sua face abaxial voltada para cima. 203

Figura 3 - Formas de onda gravadas durante as atividades alimentares do percevejo *Bagrada hilaris* em folhas de couve chinesa usando EPG AC-DC e aplicando um R_i de 10^7 Ohms. Visão geral de um evento alimentar (~22 min) mostrando as formas de onda Np e Z (não-alimentação) e as ondas Bh1 e Bh2 (alimentação) (A). Detalhe da forma de onda Bh1 e início da onda Bh2 (B, C). Detalhe da forma de onda Bh2 (D, E). 208

Figura 4 - Formas de onda gravadas durante as atividades alimentares do percevejo *Bagrada hilaris* em folhas de couve chinesa usando EPG AC-DC e aplicando um R_i de 10^9 Ohms. Visão geral de um evento alimentar (~58 min) mostrando as formas de onda Np e Z (não-alimentação), intercaladas com algumas ondas Bh1, e um evento de Bh2 (A). Detalhe da forma de onda Bh1 intercalada com eventos de não-alimentação (setas), e início da forma de onda Bh2 (B, C). Detalhe da forma de onda Bh2 (D, E). 209

Figura 5 - Formas de onda gravadas durante as atividades alimentares do percevejo *Bagrada hilaris* em folhas de couve chinesa usando EPG AC-DC e aplicando um R_i de 10^7 Ohms. Período de transição entre a forma de onda Bh2 e início da onda Bh1 (A). Detalhes da forma de onda Bh1 (B, C). 210

Figura 6 - Forma de onda Bh1 gravada após um evento da onda Bh2 durante as atividades alimentares do percevejo *Bagrada hilaris* em folhas de couve chinesa usando EPG AC-DC e aplicando um R_i de 10^9 Ohms (A). Detalhes da forma de onda Bh1 (B, C). 211

Figura 7 - Comparação da forma de onda Bh1 de <i>Bagrada hilaris</i> gravada em folhas de couve chinesa em quatro diferentes níveis de impedância de entrada (Ri), A = 10 ⁷ , B = 10 ⁸ , C = 10 ⁹ , D = 10 ¹⁰ Ohms.	212
Figura 8 - Comparação da forma de onda Bh2 de <i>Bagrada hilaris</i> gravada em folhas de couve chinesa em quatro diferentes níveis de impedância de entrada (Ri), A = 10 ⁷ , B = 10 ⁸ , C = 10 ⁹ , D = 10 ¹⁰ Ohms.	213
Figura 9 - Duração total de cada forma de onda (TWD) (em percentagem) registrada durante o comportamento alimentar de <i>Bagrada hilaris</i> em folhas de couve chinesa em diferentes tratamentos compostos por dois tipos de sinais (AC vs. DC), duas impedâncias de entrada (10 ⁷ vs. 10 ⁹ Ohms) e 550 mV de corrente elétrica no substrato.	214
Figura 10 - Danos em folha de couve chinesa (áreas circulares e esbranquiçadas) provocados pelo percevejo <i>Bagrada hilaris</i> durante suas atividades alimentares.	218

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Média (\pm EP) do peso fresco do corpo e características fenológicas de diferentes espécies de percevejos pentatomídeos avaliados em testes de fixação do fio de ouro para estudos com gráfico de penetração elétrica (EPG). 64

Tabela 2 - Média (\pm EP) do tamanho (diâmetro, mm) e do peso (mg) da gota de cola de prata, ao longo do tempo, depositada sobre o pronoto de fêmeas adultas de *Nezara viridula* lixadas e não lixadas. 64

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Sumário das formas de onda EPG-DC, suas principais características e atividades propostas para cada forma de onda gravada durante as atividades alimentares de *Edessa meditabunda* em hastes de plântulas de soja. 79

Tabela 2 - Variáveis (EPG-DC) usadas para estudar o comportamento alimentar de *Edessa meditabunda* em hastes de plântulas de soja. NPW = número de indivíduos que produziram a forma de onda. NWEI = número de vezes que a forma de onda foi produzida por inseto. WDI = duração da forma de onda por inseto (min). WDEI = duração da forma de onda por evento por inseto (min). PRT = percentagem do tempo total gravado. 81

CAPÍTULO IV

Tabela 1 - Sumário das formas de onda EPG AC-DC, suas características elétricas, e atividades biológicas propostas para cada forma de onda de *Piezodorus guildinii* gravadas em plantas de soja durante o período vegetativo (folíolo e haste - estágio V2) e período reprodutivo (vagem - estágio R5). 106

CAPÍTULO V

Tabela 1 - Sumário das formas de onda EPG AC-DC, suas principais características elétricas, e atividades biológicas propostas para cada forma de onda gravada durante o comportamento alimentar de *Dichelops melacanthus* em colmos de plântulas de milho..... 134

CAPÍTULO VI

Tabela 1 - Sumário das formas de onda EPG AC-DC, suas principais características elétricas, e atividades biológicas propostas para cada forma de onda gravada durante o comportamento alimentar de *Dichelops furcatus* em colmos de plântulas de trigo e espigas de trigo. 161

CAPÍTULO VIII

Tabela 1 - Sumário das formas de onda EPG AC-DC, suas principais características elétricas, e atividades biológicas propostas para cada forma de onda gravada durante o comportamento alimentar de *Bagrada hilaris* em folhas de couve chinesa..... 207

Tabela 2 - Médias (\pm EP) da duração (segundos) e número de eventos de variáveis respostas gravadas durante as atividades alimentares de *Bagrada hilaris* em folhas de couve chinesa usando EPG AC-DC. WDI = duração da forma de onda por inseto, WDEI = duração do evento da forma de onda por inseto, NWEI = número de eventos da forma de onda por inseto 215

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - Revisão de literatura	31
1.1 Introdução geral.....	31
1.2 Objetivos	33
1.2.1 Objetivo geral	33
1.2.2 Ojetivos específicos.....	33
1.3 Revisão bibliográfica	34
1.3.1 Insetos sugadores fitófagos - ordem Hemiptera	34
1.3.2 Técnica do EPG (<i>Electrical Penetration Graph</i>).....	35
1.3.3 Métodos utilizados para correlacionar as ondas com o local de alimentação e atividade	41
1.3.4 EPG como ferramenta para caracterizar o comportamento alimentar de percevejos	43
1.3.4.1 Estudos com EPG em percevejos pentatomídeos.....	44
1.4 Referências	45
 CAPÍTULO II - Superando o desafio de “conectar” percevejos pentatomídeos para estudos de comportamento alimentar por meio do monitoramento elétrico (EPG - <i>Electrical Penetration Graph</i>)	 54
2.1 Introdução	54
2.2 Material e Métodos	55
2.2.1 Criação dos percevejos	55
2.2.2 Fixação do fio de ouro nos percevejos	57
2.2.3 Efeito da remoção de lipídios cuticulares, peso, tamanho corporal e tamanho da gota de cola na fixação do fio de ouro	58
2.2.4 Influência do comportamento do percevejo na fixação do fio de ouro	60
2.2.5 Análise estatística.....	61
2.3 Resultados	62
2.3.1 Efeito da remoção de lipídios cuticulares, peso, tamanho corporal e tamanho da gota de cola na fixação do fio de ouro	62
2.3.2 Comportamento do percevejo afetando a efetividade da fixação do fio de ouro	65

2.4 Discussão	69
2.5 Referências	70

CAPÍTULO III - Caracterização das formas de onda oriundas das atividades alimentares do percevejo pentatomídeo *Edessa meditabunda* (F.) em hastes de soja por meio do monitoramento elétrico usando o EPG

3.1 Introdução	73
3.2 Materiais e Métodos	74
3.2.1 Criação dos percevejos e plantas de soja.....	74
3.2.2 Fixação do fio de ouro no corpo dos percevejos.....	75
3.2.3 Gravação das formas de onda	75
3.2.4 Análises histológicas dos tecidos vegetais	77
3.3 Resultados	78
3.3.1 Caracterização das formas de onda	78
3.3.2 Correlações entre as formas de onda e a posição dos estiletes no tecido vegetal	86
3.4 Discussão	88
3.5 Referências	94

CAPÍTULO IV - Caracterização das formas de onda gravadas durante o monitoramento das atividades alimentares do percevejo verde pequeno *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) em plantas de soja

4.1 Introdução	99
4.2 Materiais e Métodos	100
4.2.1 Criação dos percevejos e plantas de soja.....	100
4.2.2 Gravação do gráfico de penetração elétrica (EPG)	102
4.2.3 Análises histológicas dos tecidos vegetais	104
4.3 Resultados	104
4.3.1 Caracterização das formas de onda	104
4.3.2 Correlações entre as formas de onda e a posição da ponta dos estiletes e/ou bainha salivar nos tecidos vegetais	116
4.4 Discussão	118
4.5 Referências	124

CAPÍTULO V - Comportamento alimentar do percevejo barriga verde *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) em plântulas de milho (*Zea mays* L.): um estudo de EPG em múltiplas impedâncias de entrada e correlações histológicas ... 128

5.1 Introdução	128
5.2 Materiais e Métodos	130
5.2.1 Colônia de insetos e obtenção das plantas de milho	130
5.2.2 Gravações de EPG e aquisição dos dados	131
5.2.3 Desenho experimental	132
5.2.4 Análises histológicas do tecido vegetal	132
5.3 Resultados	133
5.3.1 Caracterização das formas de onda	133
5.3.2 Correlações entre as formas de onda e sítios específicos de alimentação via análises histológicas	144
5.4 Discussão	146
5.5 Referências	152

CAPÍTULO VI - Atividades alimentares do percevejo barriga verde *Dichelops furcatus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) caracterizadas por meio do monitoramento eletrônico (EPG) e análises histológicas .. 155

6.1 Introdução	155
6.2 Materiais e Métodos	156
6.2.1 Colônia de percevejos e obtenção das plantas de trigo	156
6.2.2 Gravações de EPG e obtenção dos dados	157
6.2.3 Análise histológica para determinar a posição dos estiletes e/ou da bainha salivar no tecido vegetal	159
6.3 Resultados	160
6.3.1 Caracterização das formas de onda	160
6.3.2 Correlação entre as formas de onda e os sítios alimentares via estudos histológicos	172
6.4 Discussão	175
6.5 Referências	180

CAPÍTULO VII - Comparações comportamentais de ingestão e excreção de diferentes espécies de percevejos pentatomídeos em diferentes fontes alimentares 184

7.1 Introdução	184
7.2 Materiais e Métodos	185
7.2.1 Criação dos percevejos	185
7.2.2 Gravações de EPG.....	185
7.2.3 Número de gotas de fezes excretadas por <i>D. melacanthus</i>	186
7.2.4 Variáveis de EPG e análise estatística.....	187
7.3 Resultados	188
7.4 Discussão	194
7.5 Referências.....	197

CAPÍTULO VIII - Monitoramento eletrônico das atividades alimentares do percevejo invasor *Bagrada hilaris* (Burmeister) (Hemiptera: Pentatomidae) em plantas de couve chinesa (*Brassica rapa* var. *pekinensis* (Lour.))..... 200

8.1 Introdução	200
8.2 Materiais e Métodos	201
8.2.1 Criação dos percevejos e obtenção das plantas	201
8.2.2 Conectando o percevejo no fio de ouro.....	202
8.2.3 Aquisição dos dados.....	203
8.2.4 Gravação das formas de onda e determinação da origem elétrica	204
8.2.5 Avaliação do efeito das mudanças elétricas no comportamento do percevejo.....	205
8.3 Resultados	205
8.3.1 Caracterização das formas de onda.....	205
8.3.2 Avaliação do efeito das mudanças elétricas no comportamento do percevejo.....	213
8.4 Discussão	217
8.5 Referências.....	221

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES GERAIS..... 224

REFERÊNCIAS DA TESE.....226

ANEXOS.....232

CAPÍTULO I

Revisão de literatura

1.1 Introdução geral

Uma vasta gama de espécies de insetos sugadores fitófagos, pertencentes à ordem Hemiptera, apresentam grande importância por se tratarem de pragas de inúmeras culturas economicamente importantes para o homem. Logo, o conhecimento do comportamento alimentar desses insetos é de grande valia para se determinar com exatidão os locais, ou seja, os tecidos vegetais explorados pelos estiletes do inseto durante suas atividades alimentares e por quanto tempo os estiletes permanecem em cada um desses tecidos, bem como as atividades realizadas em cada local.

A partir dessas informações pode-se definir o dano na estrutura atacada e possíveis estratégias de controle a fim de evitar danos econômicos. Entretanto, o grande gargalo no estudo do comportamento alimentar desses insetos é o fato de suas atividades ocorrerem internamente nos tecidos vegetais o que dificulta a observação direta (WALKER, 2000). Porém, Mclean e Kinsey (1964) proporcionaram um grande avanço tecnológico no estudo das interações, insetos sugadores - plantas hospedeiras, com a introdução do sistema de monitoramento eletrônico, denominado de EMS (*Eletronic Monitoring System*).

Nessa técnica, o inseto sugador e sua planta hospedeira fazem parte de um circuito elétrico onde uma baixa corrente elétrica, nesse caso corrente alternada (AC), e uma baixa impedância (10^6 Ohms) eram aplicadas. Inicialmente, os afídeos foram os insetos mais empregados nesses estudos, por isso, todas as atividades relacionadas ao seu comportamento alimentar já foram bem caracterizadas e detalhadas (MCLEAN e KINSEY, 1964, 1965; WALKER, 2000). Quatorze anos após, Tjallingii (1978) melhorou essa técnica, e passou a aplicar uma corrente elétrica contínua (DC) e um valor de impedância maior (10^9 Ohms), tornando o equipamento mais sensível e preciso na detecção das interações entre inseto sugador e planta hospedeira. Posteriormente, esse novo sistema passou a ser chamado de gráfico de penetração elétrica (*Electrical Penetration Graph*) (TJALLINGII, 1985a), e recentemente também passou a ser chamado de eletropenetrografia (*Electropenetrography*) pela Dra. Elaine Backus, sendo que ambos são abreviados como EPG.

A partir do momento que o circuito elétrico é fechado, o qual acontece quando o inseto insere seus estiletes nos tecidos vegetais, as diferentes atividades realizadas pelos estiletes são amplificadas e registradas pelo monitor EPG em um gráfico de comprimentos de ondas (WALKER, 2000). Nesse gráfico é possível correlacionar as diferentes formas de onda gravadas com atividades específicas dos estiletes nos tecidos vegetais. São três as principais atividades, também chamadas de fases: inserção e penetração dos estiletes (conhecida como “*pathway*” em inglês), salivação e ingestão do conteúdo celular (TJALLINGII, 1985a, 1985b, 1988; KIMMINS; TJALLINGII, 1985; TJALLINGII; HOGEN ESCH, 1993).

Além disso, é possível determinar a posição dos estiletes no tecido vegetal onde essas atividades estão sendo realizadas, ou seja, se os estiletes se encontram nas células da epiderme, parênquima, nos vasos do xilema e floema, ou endosperma de sementes. Tais correlações podem ser realizadas por meio de estudos histológicos, pelo uso de dieta artificial em que o inseto se alimenta e simultaneamente tem suas atividades gravadas com o monitor EPG, análise de excreções (como *honeydew*), entre outras (LEI et al., 1996; WALKER, 2000; JOOST et al., 2006; MIRANDA et al., 2009; SEO et al., 2009; STAFFORD; WALKER, 2009; BONANI et al., 2010).

Ao longo dos anos, o uso de monitores EPG tem sido muito empregado na caracterização da alimentação de afídeos. No entanto, outros grupos de insetos sugadores fitófagos passaram a ser alvos dos estudos (BACKUS, 1994). Entre esses, cigarrinhas (ALMEIDA; BACKUS, 2004; JOOST et al., 2006; CARPANE et al., 2011; JIN et al., 2012), mosca branca (JANSSEN et al., 1989; LEI et al., 1998, 1999; JIANG et al., 2001; JIANG; WALKER, 2003; YIN et al., 2010), cochonilhas (CALATAYUD et al., 2001; CID; FERERES, 2010), psilídeos (BONANI et al., 2010; CEN et al., 2012; SANDANAYAKA et al., 2014) e tripses (KINDT et al., 2003, 2006).

Em relação aos percevejos fitófagos (Hemiptera: Heteroptera), mesmo com sua grande importância como pragas agrícolas, muito pouco é conhecido e explorado sobre o comportamento alimentar desses insetos por meio da técnica de EPG. A princípio apenas seis espécies de percevejos tinham sido estudadas com monitores EPG antes do desenvolvimento desta tese, sendo esses: *Lygus hesperus* Knight (CLINE; BACKUS, 2002; BACKUS et al., 2007), *Anasa tristis* (De Geer) (BONJOUR et al., 1991; COOK; NEAL, 1999), *Trygonotylus caelestialium* (Kirkaldy), *Stenotus rubrovittatus* (Matsumura) (SUZUKI; HORI, 2014), *Blissus insularis* Barber e *B. occiduus* Barber (BACKUS et al., 2013). Mais recentemente um novo estudo foi publicado com o percevejo *L. hesperus* e também uma nova espécie, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (CERVANTES et al., 2016).

A princípio não se conhece os padrões de alimentação dos percevejos pentatomídeos em plantas de interesse econômico. Apesar de sua importância, os pentatomídeos raramente têm sido utilizados em estudos de comportamento alimentar ou outro qualquer, por meio da técnica de EPG. Para nosso conhecimento há apenas três trabalhos publicados na literatura, oriundos do desenvolvimento desse trabalho, os quais avaliaram as atividades alimentares dos percevejos pentatomídeos *Edessa mediotubunda* (F.) e *Piezodorus guildinii* (Westwood) em plantas de soja (LUCINI; PANIZZI, 2016; LUCINI et al., 2016), e *Dichelops melacanthus* (Dallas) em plântulas de milho (LUCINI; PANIZZI, 2017).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Caracterizar o comportamento alimentar via EPG DC e AC-DC de diferentes espécies de percevejos pentatomídeos ao se alimentar em diferentes estruturas vegetais de plantas de soja, milho e trigo.

1.2.2 Objetivos específicos

- Explorar a técnica de EPG como nova metodologia para avaliar as atividades alimentares de percevejos pentatomídeos.
- Desenvolver uma biblioteca de ondas elétricas correspondentes as diferentes atividades (penetração dos estiletes, salivação, ingestão) realizadas pelos percevejos durante sua alimentação.
- Determinar os tecidos vegetais (parênquima, xilema, floema, endosperma de sementes) explorados pelos estiletes durante as atividades alimentares de percevejos pentatomídeos em diferentes plantas hospedeiras.
- Determinar e analisar a duração das principais sessões alimentares nos diferentes tecidos vegetais explorados durante as atividades alimentares.
- Relacionar o processo alimentar com os tipos de danos observados em tecidos vegetativos e reprodutivos.

1.3 Revisão bibliográfica

1.3.1 Insetos sugadores fitófagos - ordem Hemiptera

Insetos sugadores fitófagos são caracterizados pelo aparelho bucal do tipo sugador labial, também conhecido como picador-sugador, o qual é especializado na sucção de conteúdos celulares. A ordem Hemiptera engloba vários representantes, sendo esses: mosca branca, cochonilhas, pulgões, psílídeos, cigarras, cigarrinhas e percevejos (GALLO et al., 2002).

Esses insetos apresentam as peças bucais (lábio, mandíbulas, maxilas, epifaringe, hipofaringe) atrofiadas ou modificadas em estruturas denominadas estiletes. Esses ficam alojados internamente em um tubo formado pelo lábio, chamado de bico ou rostro, o qual não tem função picadora (CHAPMAN, 1998; GALLO et al., 2002).

Em função do número de estiletes, os insetos sugadores podem ser agrupados em quatro subgrupos: hexaqueta, tetraqueta, triqueta e diqueta. Os hemípteros fitófagos estão agrupados no subgrupo tetraqueta, ou seja, apresentam quatro estiletes formados a partir das duas mandíbulas e duas maxilas. Dois canais, um com função de sucção e outro de salivação, são formados pela união dos estiletes maxilares e externamente (envolvendo os estiletes maxilares) se encontram os estiletes mandibulares (CHAPMAN, 1998; GALLO et al., 2002).

A ordem Hemiptera é subdividida em três subordens: Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha e Heteroptera, nas quais os representantes são predominantemente fitófagos (GALLO et al., 2002). Os auquenorrincos (cigarras e cigarrinhas), com exceção de alguns grupos, alimentam-se de seiva do xilema e floema, às vezes do conteúdo de células do mesófilo (GRAZIA et al., 2012). Os esternorrincos (pulgão, mosca branca, cochonilha e psílídeo) ingerem seiva do xilema e do floema (BONANI et al., 2010; POMPON et al., 2010, 2011; CEN et al., 2012) e os percevejos fitófagos (Heteroptera) tem preferência por sementes imaturas (PANIZZI; SILVA, 2012).

Os hemípteros fitófagos podem se alimentar por meio de duas formas principais, 1) via formação de bainha salivar e/ou 2) via ruptura de células. No primeiro caso, os estiletes são envolvidos por uma bainha formada por saliva solidificante (geleificante). Essa bainha ocorre durante todo o percurso de penetração dos estiletes nos tecidos da planta, até atingir o seu sítio preferido de alimentação, nesse caso os vasos condutores (BACKUS et al., 2005b).

Por outro lado, via ruptura de células, o inseto não produz uma bainha salivar completa. Nesse caso os estiletes dos insetos se movimentam rapidamente para dentro e para

fora dos tecidos de forma contínua causando o dilaceramento celular. Simultaneamente, secretam saliva aquosa que pode causar o maceramento dessas células, ou seja, degradação pela atividade de enzimas digestivas secretadas com a saliva aquosa. Portanto, os insetos que utilizam esse tipo de alimentação, ingerem o “caldo” produzido pela ruptura das células (BACKUS et al., 2005b; JIN et al., 2012).

Os insetos sugadores apresentam grande importância socioeconômica, em função dos danos potenciais que podem causar a sua planta hospedeira, muitas vezes culturas agropastoris. Esses danos podem ser divididos em diretos ou indiretos. Os danos diretos são caracterizados pela sucção do conteúdo celular e liberação de compostos tóxicos durante a salivagem que pode causar distúrbios fisiológicos na planta. Por outro lado, os danos indiretos são ocasionados principalmente pela transmissão de fitopatógenos e pelo favorecimento do crescimento do fungo, conhecido como fumagina (*Capnodium* spp.) que utiliza as excreções de *honeydew* como substrato e forma uma camada escura na superfície da folha ou órgãos atacados. Essa camada reduz a taxa fotossintética podendo ocasionar a redução da produção (GALLO et al., 2002; GRAZIA et al., 2012).

1.3.2 Técnica do EPG (*Electrical Penetration Graph*)

Diferente de insetos mastigadores, onde é possível se observar o comportamento alimentar visualmente, nos insetos sugadores tais atividades são de difícil observação, principalmente as mais relevantes. Isso porque, ocorrem internamente nos tecidos das plantas (WALKER, 2000). Portanto, técnicas especializadas são necessárias para avaliar essas atividades.

Por esse motivo surgiu a ideia do monitoramento eletrônico da alimentação, ainda na década de 60, em que McLean e Kinsey (1964, 1965) introduziram um método que permitiu monitorar de forma mais detalhada os eventos envolvidos na alimentação de insetos com aparelho bucal picador-sugador, tais como penetração dos estiletes e ingestão da seiva. Os primeiros monitores de EPG, utilizados no monitoramento de afídeos, usavam corrente alternada (AC), conhecidos como “monitores AC”. Esses monitores registram as oscilações de voltagem na interação inseto-planta por meio de baixas impedâncias de entrada (10^6 Ohms). Nessa época a técnica ficou conhecida como “sistema de monitoramento elétrico” (EMS - *Electrical Monitoring System*). Mais tarde novas versões do EPG surgiram, chamados de “monitores DC”, pois utilizam sistema de corrente contínua (DC), por exemplo, o monitor modelo Giga 8 desenvolvido pelo professor Fred Tjallingii (Figura 1A).

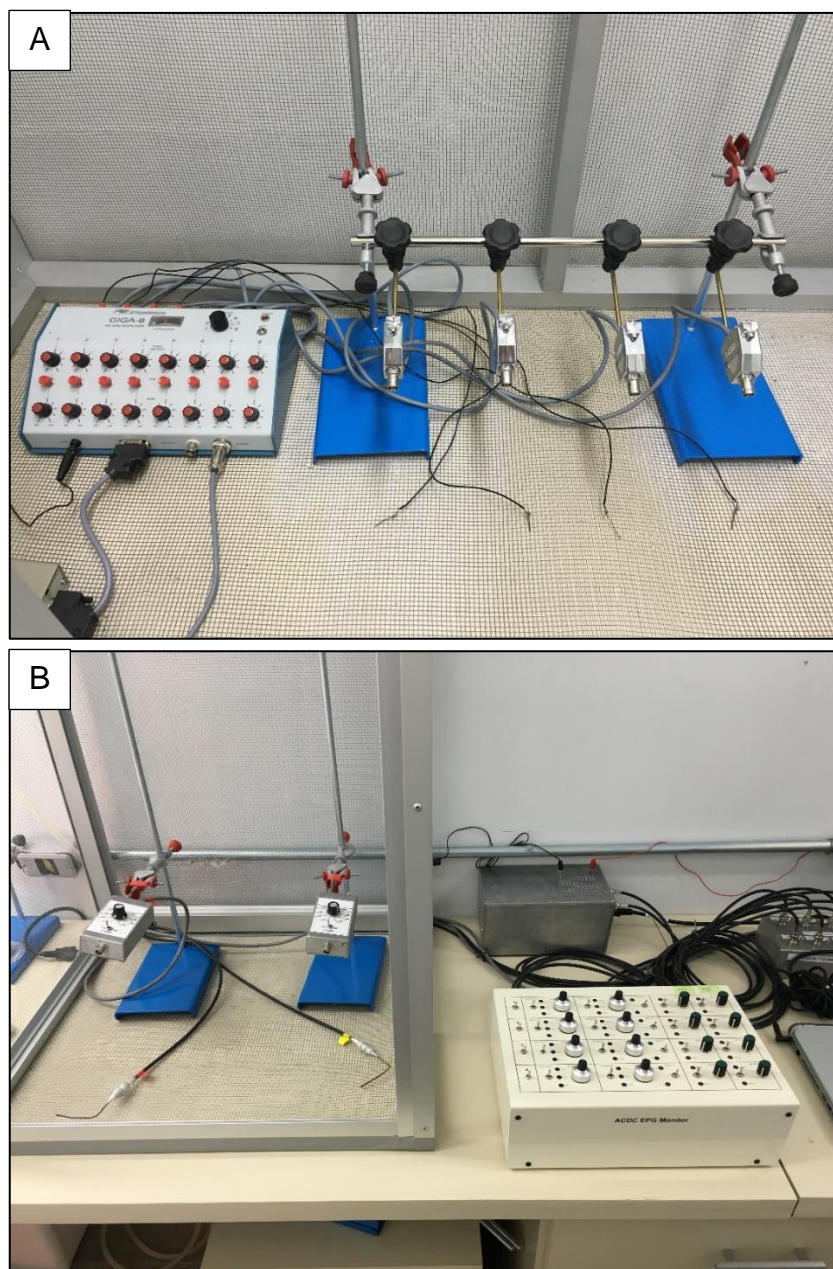


Figura 1 - Monitores de EPG utilizados na determinação do comportamento alimentar de insetos sugadores. monitor “EPG-DC” modelo Giga 8 desenvolvido por Fred Tjallingii (A). Monitor universal “EPG AC-DC” desenvolvido por Backus & Bennett (B).

Além disso, nesse novo sistema a impedância aplicada é maior (10^9 Ohms) (TJALLINGII, 1978). A partir de então, a técnica passou a ser conhecida como “gráfico de penetração elétrica” (EPG), convencionada por Tjallingii (1985a). Mais recentemente, Backus e Bennett (2009) desenvolveram um monitor universal chamado monitor EPG AC-DC, o qual permite aplicar ambas as correntes elétricas (AC e DC) e também múltiplas impedâncias de entrada (variando de 10^6 a 10^{13} Ohms) (Figura 1B). Além disso, um novo termo foi

implementado na literatura, denominado eletropenetragrafia, estabelecido pela Dra. Elaine Backus.

A técnica do EPG é empregada no estudo das interações entre insetos sugadores, seu aparelho bucal (estiletes) e as plantas hospedeiras. Ou seja, é possível monitorar o comportamento alimentar desses insetos em diferentes tecidos vegetais. O termo “comportamento alimentar” envolve inúmeras atividades, como locomoção exploratória sobre a superfície do hospedeiro, busca de novos sítios de alimentação, penetração dos estiletes e atividades associadas à ingestão de fluídos em diferentes tecidos vegetais (TJALLINGII, 2000).

Penetração dos estiletes é sinônimo do termo *probing* em inglês, o qual está relacionada com a inserção dos estiletes internamente na planta, e todas as atividades que ocorrem após sua inserção (como movimento dos estiletes, salivação, ingestão, etc). A técnica de EPG retrata todas essas atividades dos estiletes, e, portanto, abrange duas atividades básicas, penetração dos estiletes (*probing*) e não penetração dos estiletes (*non-probing*). Essa última engloba todos os comportamentos do inseto sobre o hospedeiro antes de iniciar a penetração dos estiletes, ou seja, quando fica parado ou caminhando sobre a superfície do hospedeiro (BACKUS et al., 2000).

O princípio básico da técnica é fazer de um inseto sugador e uma planta hospedeira parte de um circuito elétrico simples, onde uma determinada corrente elétrica circula pela interface inseto-planta, e essa corrente elétrica pode ser alternada (AC) ou contínua (DC) (TJALLINGII, 1978, 1988) (Figura 2).

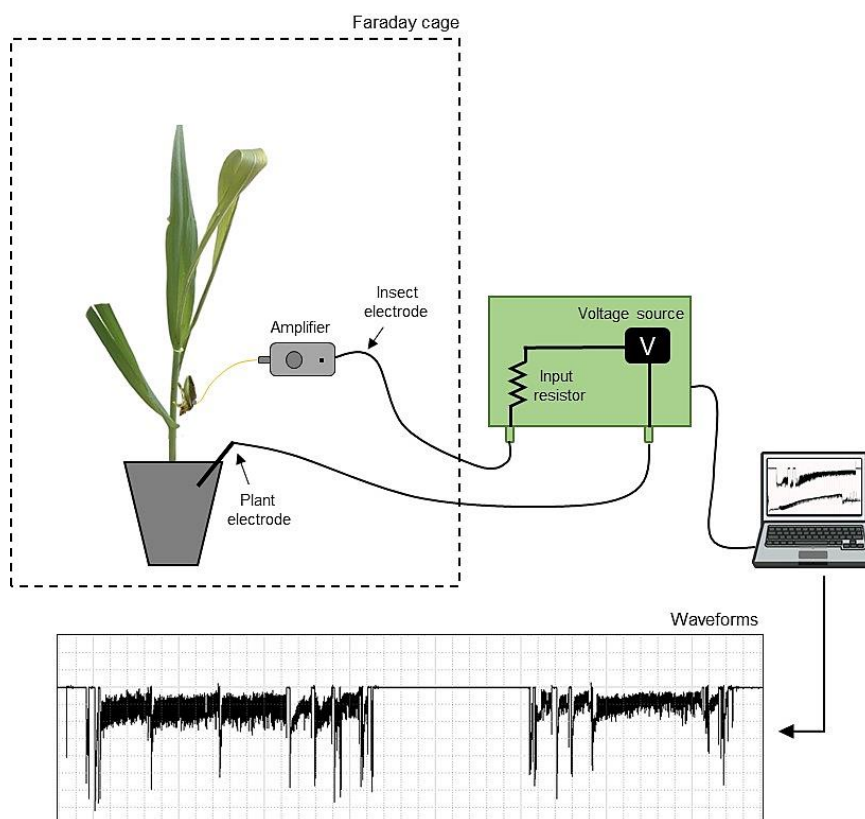


Figura 2 - Diagrama ilustrativo do sistema de monitoramento eletrônico para estudos do comportamento alimentar de insetos sugadores.

O monitor de EPG é composto por uma fonte de voltagem (AC, DC ou ambas), de dois cabos, um de saída e outro de entrada, um resistor fixo ligado ao fio de entrada e um amplificador entre o inseto e o resistor (Figura 2) (Walker, 2000; TJALLINGII, 2006). Os amplificadores (canais), bem como os hospedeiros e os insetos, são mantidos dentro de uma gaiola de Faraday durante a gravação do comportamento alimentar, isso para proteger o sistema contra perturbações elétricas externas.

O cabo de saída é inserido na planta hospedeira por meio de um eletrodo de cobre (chamado eletrodo da planta), o qual pode ser inserido diretamente no tecido vegetal ou no substrato em que a planta se encontra (Figura 2). Já o cabo de entrada (chamado eletrodo do inseto), também associada a um eletrodo de cobre soldado a um pequeno prego de cobre, é conectado a um fino e flexível fio de ouro, que varia de 2,5 a 25 μm de diâmetro, de acordo com o tamanho do inseto. Esse fio é fixado no dorso do inseto sugador por meio de uma gota de cola condutiva, geralmente cola de prata, e então é conectado no EPG *probe*, chamado amplificador (Figura 3) (WALKER, 2000).

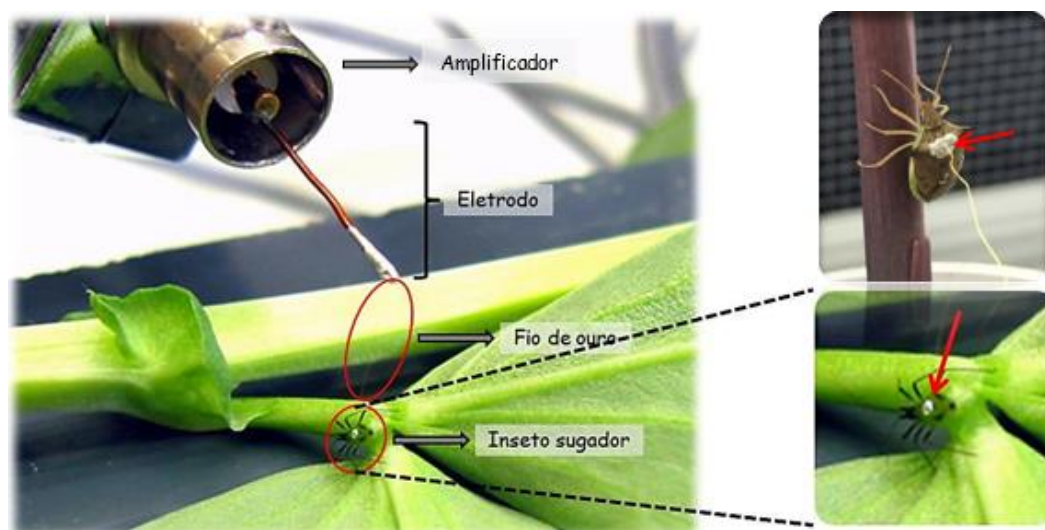


Figura 3 - Detalhe do amplificador e do eletrodo do inseto, o qual é colado a um fio de ouro e esse é colado no corpo do inseto por meio de uma gota de cola de prata condutiva (seta vermelha no detalhe), e em seguida é conectado no EPG probe (amplificador). Fonte: adaptado de Torsten Will, Institut Für Allgemeine Botanik.

O fio de ouro tem comprimento ($\pm 3-4$ cm) e flexibilidade suficiente para garantir que o inseto tenha total liberdade para explorar seu hospedeiro, não permitindo que o mesmo se enrole nas hastes e folhas da planta (WALKER, 2000). Além do mais, o comportamento do inseto é pouco afetado pela presença do fio (TJALLINGII, 1986).

Uma vez montado o circuito, quando o inseto insere seus estiletes nos tecidos vegetais esse circuito é fechado e um fluxo elétrico sai da fonte de energia, passa pelo hospedeiro, pelo inseto, pelo resistor de entrada e retorna a fonte de energia. Esse circuito simples é denominado circuito primário ou de mensuração (WALKER, 2000). A partir disso, é possível monitorar as atividades dos estiletes nos tecidos, pois a interação inseto-planta hospedeira atua no sistema como um resistor variável (TJALLINGII; GABRYS, 1999).

Essas atividades dos estiletes promovem alterações na condutividade elétrica do hospedeiro e dos canais salivar e de ingestão do inseto, além da variação da força eletromotriz (ou biopotenciais) produzida internamente no inseto ou na planta durante o processo alimentar (TJALLINGII, 1985a; WALKER, 2000). Com essas alterações, são gerados sinais elétricos distintos que são amplificados e capturados pelo monitor EPG e em seguida registrados em um gráfico de comprimento de ondas (TJALLINGII, 2006) (Figura 4).

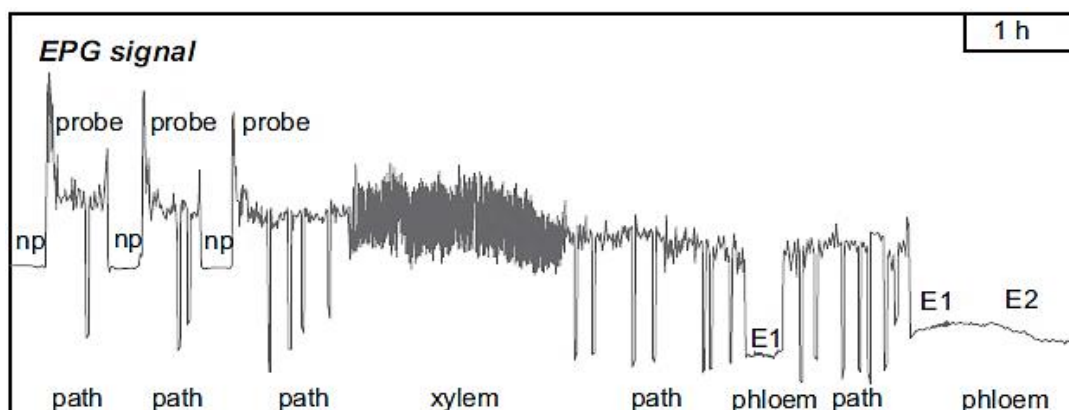


Figura 4 - Formas de onda gravadas durante as atividades alimentares de pulgões. Fonte: Tjallingii (2006).

Por convenção, o nível de voltagem da planta é calibrado para que quando os estiletes são inseridos intercelularmente a voltagem do sistema é positiva e quando os estiletes são inseridos intracelularmente o sinal é, na maior parte das vezes, negativo (TJALLINGII, 2006). Por exemplo, na Figura 4 a maior parte dos sinais apresenta voltagem positiva, refletindo a atividade extracelular durante a atividade alimentar. Entretanto, durante o inserção e penetração dos estiletes nos tecidos (*path*) e na fase de floema, a voltagem é negativa (há uma queda de potencial) indicando penetração intracelular dos estiletes (punctura de células vivas).

As formas de onda registradas são descritas e diferenciadas de acordo com as seguintes características elétricas: frequência (Hz), amplitude (mínima e máxima), nível de voltagem (intra ou extracelular) e origem elétrica (resistência [R], força eletromotriz [emf] ou a mistura de ambas) (TJALLINGII, 1978, 1985a, 1985b, 1988; TJALLINGII; HOGEN ESCH, 1993).

Essas formas de onda estão associadas a diferentes atividades dos estiletes nos tecidos da planta. São três as principais atividades, 1) inserção dos estiletes e sua penetração (avanço dos estiletes nos tecidos da planta), 2) salivação (pré-alimentação) e 3) ingestão (alimentação) do conteúdo das células. Além disso, é possível correlacionar essas atividades com a posição dos estiletes nos tecidos vegetais e o tempo gasto em cada um desses tecidos (TJALLINGII 1985a, 1985b, 1988; KIMMINS; TJALLINGII, 1985; TJALLINGII; HOGEN ESCH, 1993; WALKER, 2000).

A principal aplicação do monitor EPG é a caracterização das atividades dos estiletes do inseto nos tecidos do hospedeiro, ou seja, suas atividades alimentares. A partir da

caracterização dessas atividades, outras linhas de pesquisa podem ser exploradas e mais bem compreendidas, sendo que as duas áreas mais empregadas são, estudos de resistência de plantas a insetos sugadores fitófagos (ALVAREZ et al., 2006; DIAZ-MONTANO et al., 2007; MARCHETTI et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; GHAFAR et al., 2011; RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2011; PHILIPPI et al., 2015) e no estudo da aquisição e transmissão de fitopatógenos (WAYADANDE; NAULT, 1993; MARTÍN et al., 1997; BACKUS et al., 2005a, 2009; MORENO et al., 2005; STAFFORD et al., 2009; BONANI et al., 2010; CEN et al., 2012; KRUGNER; BACKUS, 2014; LUO et al., 2015).

Além dessas, a técnica de EPG também tem sido uma ferramenta útil no estudo das atividades de inseticidas e seus efeitos em insetos alvos e não alvos (HARREWIJN; KAYSER, 1997; HE et al., 2011a, 2011b; SERIKAWA et al., 2012; MORAES et al., 2013; CIVOLANI et al., 2014), na determinação de aceitabilidade de plantas hospedeiras (CAI et al., 2008; SANDANAYAKA; BACKUS, 2008; SANDANAYAKA et al., 2013; POINTEAU et al., 2014; THOLT et al., 2015), no efeito de indutores de resistência (PEREIRA et al., 2010; MORAES et al., 2013; CAO et al., 2014), no estudo de biótipos de insetos sugadores (LEI et al., 1998; JIANG et al., 1999; XUE et al., 2009) e no estudo de plantas transgênicas (LIU et al., 2005; XUE et al., 2009; YIN et al., 2010).

1.3.3 Métodos utilizados para correlacionar as ondas com o local de alimentação e atividade

Baseado nas características elétricas geradas pelos monitores de EPG após as gravações, é possível especular quais foram os sítios alimentares explorados e quais foram as atividades realizadas pelo inseto durante uma forma de onda específica. Porém, estudos paralelos devem ser feitos para correlacionar cada forma de onda com seu respectivo sítio de alimentação e atividade. Dentre as ferramentas que podem ser utilizadas para tal correlação, a histologia de tecidos é a mais empregada para determinar o local preciso que o inseto explorou no tecido da planta em determinada forma de onda (MIRANDA et al., 2009; SEO et al., 2009; BONANI et al., 2010; LUCINI; PANIZZI, 2016). Em estudos histológicos, a correlação da forma de onda com o local específico de alimentação é baseada na presença da bainha salivar deixada pelo inseto após a retirada dos estiletes dos tecidos da planta (Figuras 5A, B) ou mesmo pela posição da ponta do estilete no tecido, após esse ser seccionado (Figuras 6A, B).

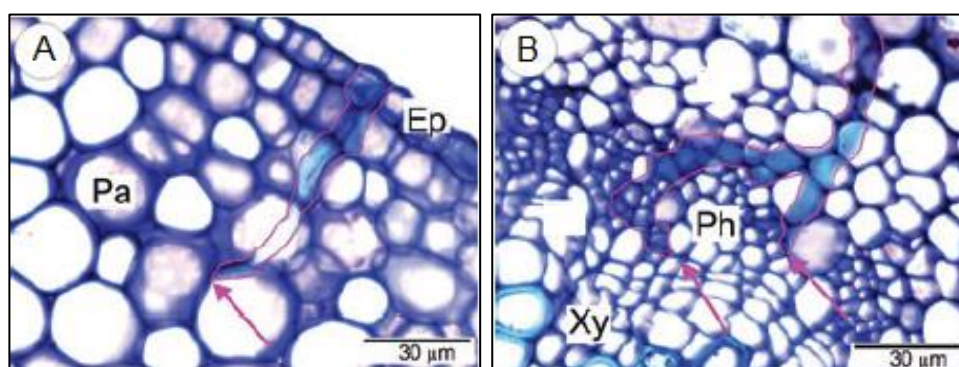


Figura 5 - Bainhas salivares de *Diaphorina citri* Kuwayama na nervura central de folhas de laranja doce. Bainha salivar terminando no tecido do parênquima durante uma forma de onda relacionada com a inserção e penetração dos estiletes (A). Bainha salivar bifurcada terminando no floema durante uma forma de onda relacionada com ingestão nesse vaso condutor (B). Ep = epiderme; Pa = parênquima; Ph = floema; Xy = xilema. Fonte: Bonani et al. (2010).

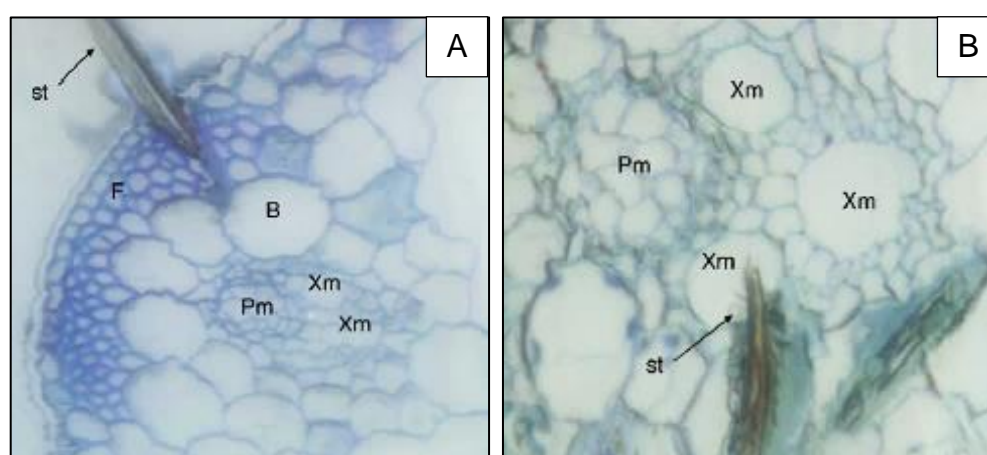


Figura 6 - Posição dos estiletes seccionados de *Nilaparvata lugens* Stål em colmos de plantas de arroz durante formas de onda específicas. Estiletes posicionados no tecido parenquimático durante a penetração dos estiletes (A). Estiletes posicionados no vaso do xilema durante a forma de onda de ingestão (B). St = estiletes, F = células fibrosas, B = células do feixe vascular, Pm = floema, Xm = xilema. Fonte: Seo et al. (2009).

Entretanto, outras técnicas podem ser empregadas, como, a análise química (pH ou concentração de aminoácidos) das excreções liberadas por alguns insetos durante a ingestão de seiva, indicando se o alimento ingerido foi oriundo dos vasos do floema ou xilema (LEI et al., 1996; MIRANDA et al., 2009; SEO et al., 2009). A observação das atividades dos estiletes diretamente em dieta artificial tem sido outra estratégia muito utilizada em estudos

para correlacionar as formas de onda com as atividades dos estiletes (CLINE; BACKUS, 2002; KINDT et al., 2003, JOOST et al., 2006, JIN et al., 2012). Até mesmo fitopatógenos transmitidos pelos insetos podem se tornar uma ferramenta útil para realizar essa correlação (PRADO; TJALLINGII, 1994; BONANI et al., 2010).

1.3.4 EPG como ferramenta para caracterizar o comportamento alimentar de percevejos

Inúmeras plantas de importância econômica são injuriadas por percevejos de várias famílias, incluindo Alydidae, Corimelaenidae, Coreidae, Cydnidae, Lygaeidae, Miridae, Pentatomidae, Phylloxeridae, Rhopalidae e Scutelleridae. Diferente de outros grupos de insetos sugadores, onde o sítio principal de alimentação são os vasos dos tecidos condutores, a grande maioria dos percevejos prefere se alimentar de sementes imaturas, pois os tecidos são mais macios e mais fáceis de serem penetradas (ver PANIZZII; SILVA, 2012). Outras espécies de percevejos têm preferência por sementes maduras e outras podem se alimentar de seiva dos tecidos condutores (SWEET, 2000).

Diferentes estratégias de alimentação podem ser utilizadas pelos percevejos, tais como, dilaceramento de células (ruptura de células), formação de bainha salivar (ocorre principalmente nos que se alimentam nos tecidos condutores), maceramento (desencadeada pela ação de enzimas digestivas) e via bomba osmótica (MILES, 1969,1972; MILES; TAYLOR, 1994; HORI, 2000). Nessa última há um aumento na concentração osmótica dos espaços intercelulares em função da secreção de saliva com alta concentração de substâncias, como açúcares (HORI, 2000).

Devido à preferência alimentar por sementes e pela capacidade de utilizar diferentes estratégias de alimentação, o comportamento alimentar desses insetos provavelmente se torna um tanto quanto diferenciado da grande maioria dos demais insetos sugadores. Além disso, os percevejos são insetos robustos e dotados de grande mobilidade e movimentos bruscos, o que dificulta a fixação do fio de ouro sobre seu corpo, a qual é necessária para manter o circuito elétrico. Por outro lado, pulgões e outros insetos pequenos são dotados de menor mobilidade sobre a planta hospedeira, logo a permanência do fio de ouro no corpo do inseto é favorecida.

Mesmo com a elevada importância desses insetos, raramente tem sido utilizada a técnica de EPG para o monitoramento alimentar de percevejos. Até o momento poucos trabalhos tem utilizado o equipamento no estudo de algumas poucas espécies de percevejos, sendo essas: *Lygus hesperus* Knight (CLINE; BACKUS, 2002; BACKUS et al., 2007;

CERVANTES et al., 2016), *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (CERVANTES et al., 2016), *Trygonotylus caelestialium* (Kirkaldy), e *Stenotus rubrovittatus* (Matsumura) (SUZUKI; HORI, 2014) todos da família Miridae, *Anasa tristis* DeGeer da família Coreidae (BONJOUR et al., 1991; COOK; NEAL, 1999) e *Blissus insularis* Barber e *B. occiduus* Barber da família Blissidae (BACKUS et al., 2013; RANGASAMY et al., 2015).

1.3.4.1 Estudos com EPG em percevejos pentatomídeos

A Família Pentatomidae é cosmopolita com a maior diversidade se concentrando nos trópicos, e em número de espécies, é a quarta maior família dentro de Heteroptera com mais de 4.700 espécies distribuídas no mundo (CAMPOS; GRAZIA, 2006; GRAZIA et al., 2015). As espécies são em sua maioria fitófagas, o que os torna insetos de elevada importância econômica quando ocorrem em culturas de interesse econômico. Os danos provocados por estes insetos são reflexos das atividades de ingestão do conteúdo celular de partes reprodutivas (sementes) e vegetativas (folha/haste/colmo). Promovem a destruição dos tecidos por meio mecânico (estresse físico) e, principalmente, por meios bioquímicos (estresse químico) causados pela ação de enzimas digestivas secretadas na saliva aquosa (PANIZZI; SILVA, 2012).

Assim como em muitos percevejos, os estudos conduzidos para averiguar as atividades alimentares de pentatomídeos até o momento têm sido baseados em observação visual e contagem de bainhas alimentares (bainhas salivares) deixadas após a penetração dos estiletes nos tecidos (BOWLING, 1979; PANIZZI et al., 1995).

A princípio não se conhece quais são os padrões de alimentação dos percevejos pentatomídeos em plantas de importância econômica. Mesmo assim, os pentatomídeos raramente têm sido utilizados em estudos de comportamento alimentar ou outro qualquer, por meio de monitores EPGs. Antes do desenvolvimento dessa tese, não haviam trabalhos publicados em revistas científicas aplicando a técnica de EPG em pentatomídeos. Havia apenas uma dissertação de mestrado, na qual se estudou o comportamento alimentar de *Nezara viridula* (L.) em plantas de soja, desenvolvida na Universidade de Winthrop, na Carolina do Sul, EUA (COOKE, 2014).

1.4 Referências

- ALMEIDA, R.; BACKUS, E. A. Stylet penetration behaviours of *Graphocephala atropunctata* (Say): EPG waveforms characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, p. 838-851, 2004.
- ALVAREZ, A. E.; TJALLINGII, W. F.; GARZO, E.; VLEESHOUWERS, V.; DICKE, M; VOSMAN, B. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 121, p. 145-157, 2006.
- BACKUS, E. A. History, development, and applications of the AC electronic monitoring system for insect feeding, pp. 1-51. In: ELLSBURY, M. M.; BACKUS, E. A.; ULLMAN, D. L. (Eds.). **History, development, and application of AC electronic insect feeding Monitors**. Entomological Society of America, Lanham, MD, 128 p, 1994.
- BACKUS, E. A.; BENNETT, W. H. The AC–DC Correlation Monitor: New EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing-sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 869-884, 2009.
- BACKUS, E. A.; CLINE, A. R.; ELLERSEICK, M. R.; SERRANO, M. S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 100, p. 296-310, 2007.
- BACKUS, E. A.; DEVANEY, M. J.; BENNETT, W. H. Comparison of signal processing circuits among seven AC electronic monitoring systems for their effects on the emf and R components of aphids (Homoptera: Aphididae) waveforms, pp. 102-143. In: WALKER, G. P.; BACKUS, E. A. (Eds.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. Entomological Society of America, Lanham, Academic Press, 260 p, 2000.
- BACKUS, E. A.; HABIBI, J.; YAN, F.; ELLERSIECK, M. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implications for transmission of *Xylella fastidiosa*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, p. 787-813, 2005a.
- BACKUS, E. A.; HOLMES, W. J.; SCHREIBER, F.; REARDON, B. J.; WALKER, G. P. Sharpshooter X wave: Correlation of an electrical penetration graph waveform with xylem penetration supports a hypothesized mechanism for *Xylella fastidiosa* inoculation. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, p. 847-867, 2009.
- BACKUS, E. A.; RANGASAMY, M.; STAMM, M.; MCAUSLANE, H. J.; CHERRY, R. Waveform library for chinch bugs (Hemiptera: Heteroptera: Blissidae): characterization of electrical penetration graph waveforms at multiple input impedances. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, p. 524-539, 2013.

BACKUS, E. A.; SERRANO, M. S.; RANGER, C. M. Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior and physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 125-151, 2005b.

BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DAGLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, p. 35-49, 2010.

BONJOUR, E. L.; FARGO, W. S.; WEBSTER, J. A.; RICHARDSON, P. E.; BRUSEWITZ, G. H. Probing behavior comparisons of squash bugs (Heteroptera: Coreidae) on cucurbit hosts. **Environmental Entomology**, v. 20, p. 143-149, 1991.

BOWLING, C. C. The stylet sheath as an indicator of feeding activity of the rice stink bug. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, p. 259-260, 1979.

CAI, X.; WU, K.; YUAN, G.; CAI, X. M.; WU, K. M.; YUAN, G. H. Electrical penetration graphs of *Adelphocoris suturalis* Jakovlev in main host crops. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 41, p. 431-436, 2008.

CAMPOS, L. A.; GRAZIA, J. Análise cladística e biogeografia de Ochlerini (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae). **Iheringia**, v. 96, p. 147-163, 2006.

CAO, H. H.; ZHANG, M.; ZHAO, H.; ZHANG, Y.; WANG, X. X.; GUO, S. S.; ZHANG, Z. F.; LIU, T. X. Deciphering the mechanism of β -aminobutyric acid-induced resistance in wheat to the grain aphid, *Sitobion avenae*. **PLoS ONE**, v. 9: e91768. doi 10.1371/journal.pone.0091768, 2014.

CALATAYUD, P. A.; SELIGMANN, C. D.; POLANIA, M. A.; BELLOTTI, A. C. Influence of parasitism by encyrtid parasitoids on the feeding behaviour of the cassava mealybug *Phenacoccus herreni*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 98, p. 271-278, 2001.

CARPANE, P.; WAYADANDE, A.; BACKUS, E.; DOLEZAL, W.; FLETCHER, J. Characterization and correlation of new electrical penetration graph waveforms for the corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, p. 515-525, 2011.

CEN, Y.; YANG, C.; HOLFORD, P.; BEATTIE, G. A. C.; SPOONER-HART, R. N.; LIANG, G.; DENG, X. Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 143, p. 13-22, 2012.

CERVANTES, F. A.; BACKUS, E. A.; GODFREY, L.; AKBAR, W.; CLARK, T. L. Characterization of an EPG waveform library for adult *Lygus lineolaris* and *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton squares. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 684-697, 2016.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 4 ed. Cambridge University Press, 788 p, 1998.

CID, M.; FERERES, F. Characterization of the probing and feeding behavior of *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) on grapevine. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, p. 404-417, 2010.

CIVOLANI, S.; CASSANELLI, S.; CHICCA, M.; RISON, J. L.; BASSI, A.; ALVAREZ, J. M.; ANNA, I. B.; PARRELLA, G.; GIORGINI, M.; FANO, E. A. An EPG study of the probing behavior of adult *Bemisia tabaci* Biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) following exposure to cyantraniliprole. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 910-919, 2014.

CLINE, A. R.; BACKUS, E. A. Correlations among AC electronic monitoring waveforms, body postures, and stylet penetration behaviors of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). **Environmental Entomology**, v. 31, p. 538-549, 2002.

COOK, C. A.; NEAL, J. J. Feeding behavior of larvae of *Anasa tristis* (Heteroptera: Coreidae) on pumpkin and cucumber. **Environmental Entomology**, v. 28, p. 173-177, 1999.

COOKE, S. B. **Probing behavior of southern green stink bug, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae), on the soybean plant, *Glycine max***. Carolina do Sul, 113 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade de Winthrop, Carolina do Sul, 2014.

DIAZ-MONTANO, J.; REESE, J. C.; LOUIS, J.; CAMPBELL, L. R.; SCHAPAUGH, W. T. Feeding behavior by the soybean aphid (Hemiptera: Aphididae) on resistant and susceptible soybean genotypes. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, p. 984-989, 2007.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, FEALQ, 920 p, 2002.

GHAFFAR, M. B. B. A.; PRITCHARD, J.; FORD-LLOYD, B. Brown planthopper (*N. lugens* stal) feeding behaviour on rice germplasm as an indicator of resistance. **PLoS ONE**, v. 6: e22137. doi:10.1371/journal.pone.0022137, 2011.

GRAZIA, J.; CAVICHIOLI, R. R.; WOLFF, V. R. S.; FERNANDES, J. A. M.; TAKIYA, D. M. Hemiptera, pp. 347-406. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, A. S.; CONSTANTINO, R. (Eds.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto, Holos Editora, 810 p, 2012.

GRAZIA, J.; PANIZZI, A. R.; GREVE, C.; SCHWERTNER, F.; CAMPOS, L. A.; GARBELOTTO, T. A.; FERNANDES, J. A. M. Stink Bugs (Pentatomidae), pp. 681-756. In: Panizzi, A. R., Grazia, J. (Eds.) **True bugs (Heteroptera) of the neotropics**. Dordrecht, Springer, 901 p, 2015.

HARREWIJN, P.; KAYSER, H. Pymetrozine, a fast-acting and selective inhibitor of aphid feeding. *In-situ* studies with electronic monitoring of feeding behaviour. **Pesticide Science**, v. 49, p. 130-140, 1997.

HE, Y.; ZHANG, J.; CHEN, J.; WU, Q.; CHEN, L.; CHEN, L.; XIAO, P.; ZHU, Y. C. Influence of pymetrozine on feeding behaviors of three rice planthoppers and a rice

leafhopper using electrical penetration graphs. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, p. 1877-1884, 2011a.

HE, Y.; CHEN, J.; ZHANG, J.; CHEN, L.; SHEN, J.; ZHU, Y. C. Penetration graphic evidence that pymetrozine toxicity to rice brown planthopper is by inhibition of phloem feeding. **Pest Management Science**, v. 67, p. 483-491, 2011b.

HORI, K. Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera, pp. 11-36. In: SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R. (Eds.). **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton, CRC Press, 856 p, 2000.

JANSSEN, J. A. M.; TJALLINGII, W. F.; VAN LENTEREN, J. C. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 52, p. 69-81, 1989.

JIANG, Y. X.; LEI, H.; COLLAR, J. L.; MARTÍN, B.; MUÑIZ, M.; FERERES, A. Probing and feeding behavior of two distinct biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 357-366, 1999.

JIANG, Y. X.; NOMBELA, G.; MUÑIZ, M. Analysis by DC-EPG of the resistance to *Bemisia tabaci* on Mi-tomato line. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 99, p. 295-302, 2001.

JIANG, Y. X.; WALKER, G. P. Electrical penetration graphs of the nymphal stage of *Bemisia argentifolii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 109, p. 101-111, 2003.

JIN, S.; CHEN, Z. M.; BACKUS, E. A.; SUN, X. L.; XIAO, B. Characterization of EPG waveforms for the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), on tea plants and their correlation with stylet activities. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 1235-1244, 2012.

JOOST, P. H.; BACKUS, E. A.; MORGAN, D.; YAN, F. Correlation of stylet activities by the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata* (Say), with electrical penetration graph (EPG) waveforms. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 327-337, 2006.

KIMMINS, E. M.; TJALLINGII, E. F. Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 39, p. 135-141, 1985.

KINDT, F.; JOOSTEN, N. N.; PETERS, D.; TJALLINGII, W. F. Characterization of the feeding behaviour of western flower thrips in terms of electrical penetration graph (EPG) waveforms. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 183-191, 2003.

KINDT, F.; JOOSTEN, N. N.; PETERS, D.; TJALLINGII, W. F. Electrical penetration graphs of thrips revised: Combining DC-and AC-EPG signals. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 1-10, 2006.

KRUGNER, R.; BACKUS, E. A. Plant water stress effects on stylet probing behaviors of *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) associated with acquisition and

inoculation of the bacterium *Xylella fastidiosa*. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 66-74, 2014.

LEI, H.; TJALLINGII, W. F.; VAN LENTEREN, J. C.; XU, R. M. Stylet penetration by larvae of the greenhouse whitefly on cucumber. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 79, p. 77-84, 1996.

LEI, H.; TJALLINGII, W. F.; VAN LENTEREN, J. C. Probing and feeding characteristics of the greenhouse whitefly in association with host-plant acceptance and whitefly strains. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 88, p. 73-80, 1998.

LEI, H.; VAN LENTEREN, J. C.; TJALLINGII, W. F. Analysis of resistance in tomato and sweet pepper against the greenhouse whitefly using electrically monitored and visually observed probing and feeding behaviour. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, p. 299-309, 1999.

LIU, X. D.; ZHAI, B. P.; ZHANG, X. X.; ZONG, M. J. Impact of transgenic cotton plants on a non-target pest, *Aphis gossypii* Glover. **Ecological Entomology**, v. 30, p. 307-315, 2005.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa mediatubunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring pentatomids for EPG. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, p. 118-132, 2016.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Feeding behavior of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) on maize seedlings: An EPG analysis of multiple input impedances and histology correlation. **Annals of the Entomological Society of America** v. 110, *in press*, 2017.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R.; BACKUS, E. A. Characterization of an EPG waveform library for redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), on soybean plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 198-210, 2016.

LUO, X.; YEN, A. L.; POWELL, K. S.; WU, F.; WANG, Y.; ZENG, L.; YANG, Y.; CEN, Y. Feeding behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its acquisition of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', on huanglongbing-infected *Citrus reticulata* leaves of several maturity stages. **Florida Entomologist**, v. 98, p. 186-192, 2015.

MARCHETTI, E.; CIVOLANI, S.; LEIS, M.; CHICCA, M.; TJALLINGII, W. F.; PASQUALINI, E.; BARONIO, P. Tissue location of resistance in apple to the rosy apple aphid established by electrical penetration graphs. **Bulletin of insectology**, v. 62, p. 203-208, 2009.

MARTÍN, B.; COLLAR, J. L.; TJALLINGII, W. F.; FERERES, A. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2701-2705, 1997.

MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, v. 202, p. 1358-1359, 1964.

MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. Identification of electrically recorded curve patterns associated with aphid feeding and salivation. **Nature**, v. 205, p. 1130-1131, 1965.

MILES, P. W. Interaction of plant phenols and salivary phenolases in the relationship between plants and Hemiptera. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 12, p. 736-744, 1969.

MILES, P. W. The saliva of Hemiptera. **Advances in Insect Physiology**, v. 9, p. 183-255, 1972.

MILES, P. W. TAYLOR, G. S. "Osmotic pump" feeding by coreids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 73, p. 166-173, 1994.

MIRANDA, M. P.; FERERES, A.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of *Bucephalogonia xanthophis*, a vector of *Xylella fastidiosa* in citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 35-46, 2009.

MORAES, J. C.; GOUSSAIN, M. M.; VILELA, M.; PRADO, E. Comportamento de prova do pulgão-verde *Schizaphis graminum* (Rond.) (Hemiptera: Aphididae) em plantas de trigo tratadas com silício e dimetoato. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 83-90, 2013.

MORENO, A.; PALACIOS, I.; BLANC, S.; FERERES, A. Intracellular salivation is the mechanism involved in the inoculation of Cauliflower mosaic virus by its major vectors, *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, p. 763-769, 2005.

PANIZZI, A. R.; NIVA C. C.; HIROSE, E. Feeding preference by stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) for seeds within soybean pods. **Journal of Entomological Science**, v. 30, p. 333-341, 1995.

PANIZZI, A. R.; SILVA, F. A. C. Seed-sucking bugs (Heteroptera), pp. 295-324. In: PANIZZI, A. R., PARRA, J. R. P. (Eds.). **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Embrapa, CRC Press, 750 p, 2012.

PEREIRA, R. R. C.; MORAES, J. C.; PRADO, E.; DACOSTA, R. R. Resistance inducing agents on the biology and probing behaviour of the greenbug in wheat. **Scientia Agricola**, v. 67, p. 430-434, 2010.

PHILIPPI, J.; SCHLIEPHAKE, E.; JÜRGENS, H. U.; JANSEN, G.; ORDON, F. Feeding behavior of aphids on narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*) genotypes varying in the content of quinolizidine alkaloids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 156, p. 37-51, 2015.

POMPON, J.; QUIRING, D.; GIORDANENGO, P.; PELLETIER, Y. Role of xylem consumption on osmoregulation in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 610-615, 2010.

POMPON, J.; QUIRING, D.; GIORDANENGO, P.; PELLETIER, Y. A phloem-sap feeder mixes phloem and xylem sap to regulate osmotic potential. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 1317-1322, 2011.

- POINTEAU, S.; JAGUENET, E.; COUTY, A.; DUBOIS, F.; RAMBAUD, C.; AMELINE, A. Differential performance and behavior of the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*, on three species of the biomass crop miscanthus. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 135-141, 2014.
- PRADO, E.; TJALLINGII, W. F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 72, p. 157-165, 1994.
- RANGASAMY, M.; MCAUSLANE, H. J.; BACKUS, E. A.; CHERRY, R. H. Differential probing behavior of *Blissus insularis* (Hemiptera: Blissidae) on resistant and susceptible St. Augustine grasses. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, p. 780-788, 2015.
- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. J.; GARZO, E.; BONANI, J. P.; FERERES, A.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. Whitefly resistance traits derived from the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* affect the preference and feeding behavior of *Bemisia tabaci* and reduce the spread of tomato yellow leaf curl virus. **Phytopathology**, v. 101, p. 1191-1201, 2011.
- SANDANAYAKA, W. R. M.; BACKUS, E. A. Quantitative comparison of stylet penetration behaviors of glassy-winged sharpshooter on selected hosts. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, p. 1183-1197, 2008.
- SANDANAYAKA, W. R. M.; JIA, Y.; CHARLES, J. G. EPG technique as a tool to reveal host plant acceptance by xylem sap-feeding insects. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, p. 519-529, 2013.
- SANDANAYAKA, W. R. M.; MORENO, A.; TOOMAN, L. K.; PAGE-WEIR, N. E. M.; FERERES, A. Stylet penetration activities linked to the acquisition and inoculation of *Candidatus Liberibacter solanacearum* by its vector tomato potato psyllid. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 151, p. 170-181, 2014.
- SERIKAWA, R. H.; BACKUS, E. A.; ROGERS, M. E. Effects of soil-applied imidacloprid on asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) feeding behavior. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 1492-1502, 2012.
- SEO, B. Y.; KNOW, Y. H.; JUNG, J. K.; KIM, G. H. Electrical penetration graphic waveforms in relation to the actual positions of the stylet tips of *Nilaparvata lugens* in rice tissue. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 12, p. 89-95, 2009.
- STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P. Characterization and correlation of DC electrical penetration graph waveforms with feeding behavior of beet leafhopper, *Circulifer tenellus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 113-129, 2009.
- STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P.; CREAMER, R. Stylet penetration behavior resulting in inoculation of beet severe curly top virus by beet leafhopper, *Circulifer tenellus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 130-137, 2009.

SWEET II, M. H. Seed and chinch bugs (Lygaeoidea), pp. 143-264. In: SCHAEFER, C. W., PANIZZI, A. R. (Eds.). **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton, CRC Press, 856 p, 2000.

SUZUKI, Y.; HORI, M. Diurnal locomotion and feeding activities of two rice-ear bugs, *Trigonotylus caelestialium* and *Stenotus rubrovittatus* (Hemiptera: Heteroptera: Miridae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 49, p. 149-157, 2014.

THOLT, G.; SAMU, F.; KISS, B. Feeding behaviour of a virus-vector leafhopper on host and non-host plants characterized by electrical penetration graphs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 155, p. 123-136, 2015.

TJALLINGII, W. F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, p. 721-730, 1978.

TJALLINGII, W. F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 177-186, 1985a.

TJALLINGII, W. F. Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 187-193, 1985b.

TJALLINGII, W. F. Wire effects on aphids during electrical recording of stylet penetration. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 40, p. 89-98, 1986.

TJALLINGII, W. F. Electrical recording of stylet penetration activities, pp. 95-108. In: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Eds.). **World crop pests: Aphids, their biology, natural enemies and control**. Amsterdam, Elsevier, v. 2B, 382 p, 1988.

TJALLINGII, W. F. Comparison of AC and DC systems for electronic monitoring of stylet penetration activities by homopterans, pp. 41-69. In: WALKER, G. P.; BACKUS, E. A. (Eds.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. Entomological Society of America, Lanham, Academic Press, 260 p, 2000.

TJALLINGII, W. F. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 739-745, 2006.

TJALLINGII, W. F.; GABRYS, B. Anomalous stylet punctures of phloem sieve elements by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 91, p. 97-103, 1999.

TJALLINGII, W. F.; HOGEN ESCH, T. Fine structure of the stylet route in plant tissues by some aphids. **Physiological Entomology**, v. 18, p. 317-328, 1993.

XUE, K.; WANG, X. Y.; HUANG, C. H.; WANG, R. J.; LIU, B.; YAN, F. M.; XU, C. R. Stylet penetration behaviors of the cotton aphid *Aphis gossypii* on transgenic Bt cotton. **Insect Science**, v. 16, p. 137-146, 2009.

WALKER, G. P. A beginner's guide to electronic monitoring of homopteran probing behavior, pp. 14-40. In: WALKER, G. P.; BACKUS, E. A. (Eds.). **Principles and**

applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior. Entomological Society of America, Lanham, Academic Press, 260 p, 2000.

WAYADANDE, A. C.; NAULT, L. R. Leafhopper probing behavior associated with maize chlorotic dwarf virus transmission to maize. **Phytopathology**, v. 83, v. 522-526, 1993.

YIN, H. D.; WANG, X. Y.; XUEL, K.; HUANG, C. H.; WANG, R. J.; YAN, F. M.; XU, C. R. Impacts of transgenic Bt cotton on the stylet penetration behaviors of *Bemisia tabaci* biotype B: Evidence from laboratory experiments. **Insect Science**, v. 17, p. 344-352, 2010.

CAPÍTULO II

Superando o desafio de “conectar” percevejos pentatomídeos para estudos de comportamento alimentar por meio do monitoramento elétrico (EPG – *Electrical Penetration Graph*)

2.1 Introdução

O estudo do comportamento alimentar de hemípteros foi revolucionado pela introdução do sistema eletrônico de monitoramento alimentar desenvolvido por McLean e Kinsey (1964) e aperfeiçoado por Tjallingii (1978). Essa técnica, nomeada de EPG (gráfico de penetração elétrica) (TJALLINGII, 1985), permite mensurar o comportamento dos estiletos (mandíbulas + maxilas) internamente no alimento, e tem sido utilizado principalmente em afídeos, psilídeos e cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha) (PRADO; TJALLINGII, 1994; ALMEIDA; BACKUS, 2004; BACKUS et al., 2009; STAFFORD et al., 2009; BONANI et al., 2010; CEN et al., 2012; JIN et al., 2012)

Quanto aos percevejos (Hemiptera: Heteroptera), poucos estudos para monitorar as atividades alimentares usando a técnica de EPG tem sido conduzidos. As seguintes espécies foram estudadas: *Lygus hesperus* Knight (CLINE; BACKUS, 2002; BACKUS et al., 2007; CERVANTES et al., 2016), *Trygonotylus caelestialium* (Kirkaldy), *Stenotus rubrovittatus* (Matsumura) (SUZUKI; HORI, 2014), *Anasa tristis* DeGeer (BONJOUR et al., 1991; COOK; NEAL, 1999), *Blissus insularis* Barber e *B. occiduus* Barber (BACKUS et al., 2013) e mais recentemente *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (CERVANTES et al., 2016), *Edessa mediatubunda* (F.) (LUCINI; PANIZZI, 2016), *Piezodorus guildinii* (Westwood) (LUCINI et al., 2016), e *Dichelops melacanthus* (Dallas) (LUCINI; PANIZZI, 2017).

Os percevejos, comparados a outros insetos sugadores de plantas normalmente estudados pelo EPG são, em geral, maiores, muito mais robustos, com movimentos bruscos que dificultam a permanência do fio de ouro aderido no seu corpo, o que é necessário para formar o circuito elétrico. Portanto, o sucesso da fixação do fio de ouro no corpo do percevejo deve levar em consideração seu comportamento.

Além disso, os lipídios cuticulares presentes sobre a superfície corporal se constituem em outro fator que pode afetar o sucesso da fixação do fio de ouro no corpo dos percevejos. Por exemplo, lipídios cuticulares presentes sobre a superfície do corpo de *Nezara*

viridula L., são hidrofóbicos (SOSÁ-GOMEZ et al., 1997). Em virtude da cola de prata, usada na fixação do fio de ouro, conter água em sua composição, esses lipídios podem reduzir a efetividade da fixação. Portanto, a sua remoção pode melhorar o sucesso da fixação do fio de ouro e a condutividade elétrica.

Nesse trabalho reportamos os resultados de testes que tiveram o objetivo de avaliar a efetividade da fixação do fio de ouro no corpo do percevejo. Para isso, foram comparados adultos pentatomídeos de diferentes dimensões e comportamentos, sendo esses: *Loxa deducta* (Walker), *N. viridula* e *P. guildinii*. Foi também comparada a efetividade de fixação do fio de ouro entre insetos que tiveram seus lipídios cuticulares removidos (por raspagem) com aqueles sem a remoção dos lipídios.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Criação dos percevejos

Colônias das seguintes espécies de percevejos foram estabelecidas em laboratório: *P. guildinii*, *N. viridula* e *L. deducta*. Os adultos foram coletados no campo da estação experimental da Embrapa Trigo em Passo Fundo, RS, Brasil (28° 15' S; 52° 24' O). Os insetos foram transportados para o laboratório de entomologia da estação e colocados em caixas plásticas de criação (25 x 20 x 20 cm) (Plasvale Ltda., Gaspar, SC. Brasil) (Figura 1A). De outubro de 2013 a julho de 2014, as caixas plásticas foram mantidas em câmara climatizada (25 ± 1°C, 65 ± 5% UR, fotoperíodo 14hL:10hE). As caixas de criação eram forradas com papel filtro e como alimento foi fornecido uma dieta natural padrão, composta de vagens frescas de feijão verde, *Phaseolus vulgaris* L., amendoim cru em grão, *Arachis hypogaea* L., sementes maduras de soja, *Glycine max* (L.) e frutos (bagas) de ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait (quando disponível) (Figura 1B). Como substrato para as fêmeas ovipositarem, foi adicionado um chumaço de algodão na gaiola de criação, exceto para *P. guildinii*, no qual foi adicionado também fragmentos de barbante (Figura 1C).



Figura 1 - Método de criação dos percevejos pentatomídeos, nesse caso *Piezodorus guildinii*, no laboratório de entomologia. Potes plásticos utilizados para criação dos adultos e obtenção de ovos (A). Mistura de alimentos utilizados para criação de percevejos em laboratório (B). Detalhe das posturas em barbante (C). Posturas retiradas e colocadas em caixas gerbox para eclosão e desenvolvimento das ninfas (D). Ninfas em desenvolvimento (E).

O alimento foi substituído, usualmente, duas vezes por semana ou sempre que necessário. No momento da troca de alimento, os ovos eram coletados e acondicionados em caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), contendo vagem de feijão e espuma umedecida em água (Figura 1D), para eclosão e desenvolvimento das ninfas até atingirem o estágio adulto, reiniciando o ciclo (Figura 1E). A colônia foi revigorada sempre que possível por meio da adição de novos adultos coletados no campo.

Nos experimentos foram utilizadas apenas fêmeas com pesos e medidas corporais (largura e comprimento) similares entre os indivíduos em cada espécie avaliada. O peso foi determinado em balança de precisão (modelo Sartorius BP210S) e as medidas de largura (região do pronoto) e comprimento (ápice das jugas até o final dos hemiélitros) foram mensuradas a partir de fotografias capturadas com câmera digital (modelo Sony DSC-W215), e processadas no software ImageJ, versão 1.47 (National Institutes of Health, Maryland, USA).

2.2.2 Fixação do fio de ouro nos percevejos

Para anexar o fio de ouro sobre o pronoto do percevejo, as fêmeas adultas foram imobilizadas, no topo de uma tampa de placa de Petri, utilizando uma fita adesiva presa na porção posterior do abdômen (Paula Mitchell, informação pessoal) (Figura 2A). Um pequeno filamento de fio de ouro (3 cm de comprimento e 0,1 mm de diâmetro) (Sigmund Cohn Corporation, Mount Vernon, NY, USA), foi colado a um eletrodo de cobre (± 3 cm de comprimento) que tinha sido previamente soldado a um pequeno prego de cobre (Figura 2B). Em uma das extremidades do fio de ouro, um pequeno “looping” foi feito, com auxílio de uma pinça entomológica, para expandir a superfície de contato do fio de ouro com o pronoto do percevejo.

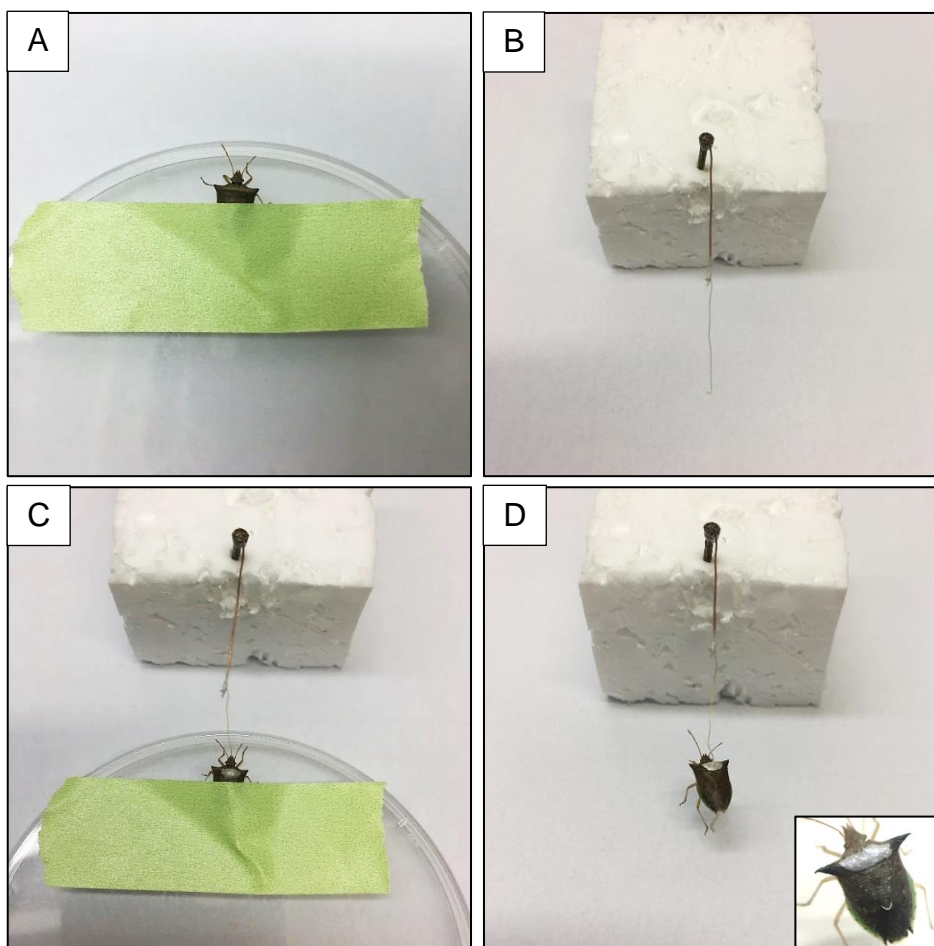


Figura 2 - Metodologia para fixação do fio de ouro no corpo do percevejo. Fêmea imobilizada, no topo de uma tampa de placa de petri, utilizando uma fita adesiva (A). Detalhe do eletrodo do inseto, fixado no bloco de isopor, contendo o filamento de fio de ouro com um pequeno “looping” na extremidade (B). Gota de cola de prata depositada no pronoto do percevejo e o fio de ouro mergulhado na cola (C). Percevejo suspenso no ar após o período de secagem da cola, e detalhe da fixação do fio de ouro no corpo do percevejo (D).

O eletrodo foi mantido preso em um bloco de isopor, em seguida, uma gota de cola de prata foi colocada no centro do pronoto, e o *looping* do fio de ouro foi mergulhado na cola, e deixado secar durante ± 40 minutos (Figura 2C). Depois disso, os percevejos foram libertados (a fita adesiva foi cuidadosamente removida para evitar danos) e permaneceram pendurados no ar por mais ou menos 10 minutos antes de serem utilizados nos testes (Figura 2D). A cola de prata foi produzida misturando água destilada, flocos de prata (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e cola branca (Elmer's Glue.All, Westerville, OH, USA) na proporção de 1:1:1 (V:P:V).

2.2.3 Efeito da remoção de lipídios cuticulares, peso, tamanho corporal e tamanho da gota de cola na fixação do fio de ouro

Para estudar o efeito da remoção de lipídios cuticulares na efetividade da ligação do fio de ouro ao pronoto do percevejo, dois grupos de insetos para cada espécie estudada ($n = 15$ percevejos fêmeas adultas para cada espécie) foram fixados no fio. No primeiro grupo, os percevejos foram imobilizados com fita adesiva sobre uma tampa plástica (como descrito acima), e tiveram seu pronoto lixado (Figura 3A) usando um fragmento de lixa odontológica ($2,0 \times 0,4$ cm) (Metalúrgica FAVA Ind. & Com., Modelo MF 435L, SP, Brasil), que foi esfregada no corpo do inseto 10 vezes (cerca de 10 s). As áreas raspadas receberam a gota de cola de prata para prender o fio de ouro. No segundo grupo de percevejos, os indivíduos foram imobilizados e presos ao fio de ouro da mesma forma aos insetos do grupo anterior, contudo, seus pronotos não foram lixados (Figura 3B).

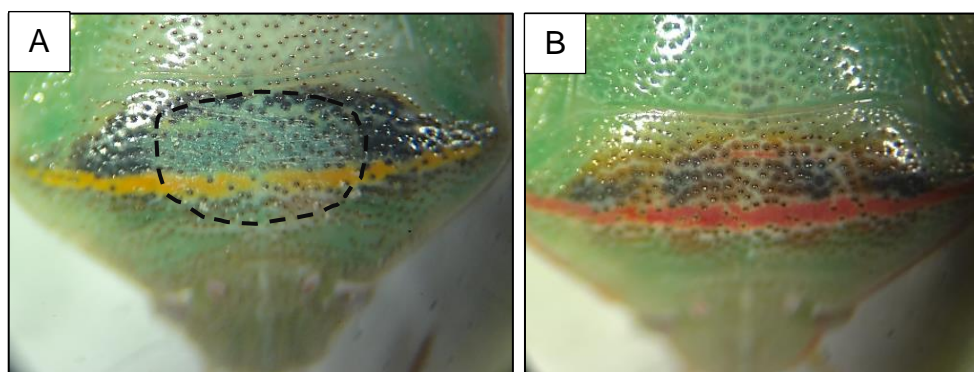


Figura 3 - Detalhe do pronoto de uma fêmea adulta de *Piezodorus guildinii* após ser submetido ao processo de raspagem, ou seja, lixado (A) (linha pontilhada delimita a região lixada). Detalhe do pronoto sem a raspagem (B).

Os dois grupos de percevejos foram testados em duas situações. No primeiro caso, os percevejos fixados ao fio permaneceram livres no ar, ou seja, pendurados (Figura 4A), e no segundo caso, imediatamente após o término do tempo de secagem da cola (± 40 minutos), os percevejos foram retirados e, em seguida, colocados sobre o alimento (uma vagem de feijão verde) (Figura 4B). O número de percevejos que se soltaram do fio de ouro foi gravado aos 5, 10, 20, 40, 80 e 960 min (16 h), este último intervalo de tempo é comum em estudos com EPG para a gravação das atividades alimentares, após terem sido mantidos pendurados e sobre o alimento (vagem de feijão).

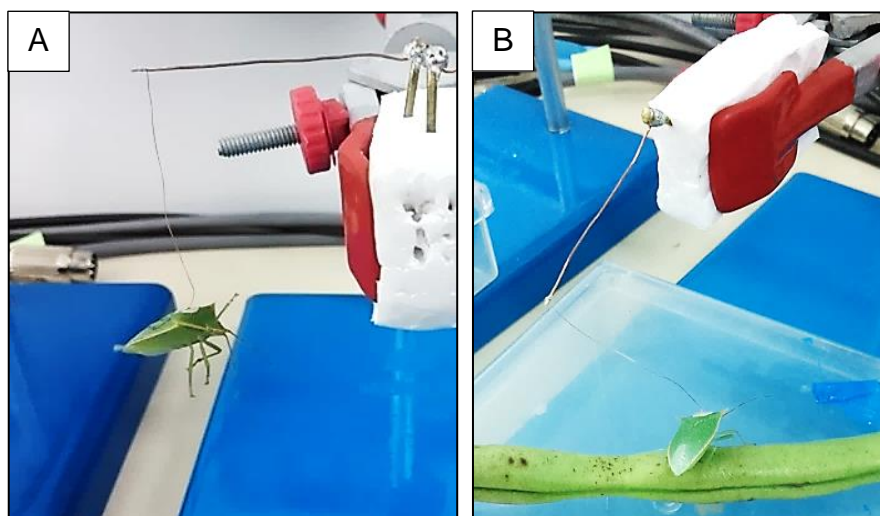


Figura 4 - Detalhe do experimento com fêmeas adultas de *Loxa deducta* mantidas em duas situações distintas para avaliação do seu comportamento. Percevejo preso ao fio de ouro e mantido pendurado no ar durante o período de avaliação (A). Percevejo preso ao fio de ouro e colocado sobre o alimento (uma vagem de feijão verde) durante o período de avaliação (B).

Nossa hipótese é que o tamanho da gota de cola de prata colocada sobre o pronoto de adultos poderia afetar a fixação do percevejo ao fio de ouro ao longo do tempo. Portanto, outro grupo de fêmeas, nesse caso *N. viridula*, foi selecionado para avaliar o diâmetro (mm) da gota de cola de prata após 0, 20, 40 e 60 min ($n = 10$) de sua deposição sobre o pronoto do percevejo. Após cada período de tempo, foram capturadas imagens com uma câmera digital (modelo Sony DSC-W215), e essas foram processadas usando o software ImageJ, versão 1.47 para determinar o diâmetro da gota de cola.

Também foi comparado o peso (mg) da gota de cola ($n = 60$) após o término do experimento para certificar que as diferentes gotas colocadas sobre os dois grupos de insetos,

lixado e não lixado, foram equivalentes. Para isso, após o período de avaliação, a cola de prata foi retirada do fio de ouro e/ou inseto e pesada em balança de precisão.

O peso fresco corporal (mg), largura do corpo (mm) e comprimento do corpo (mm) de fêmeas ($n = 20$) de *P. guildinii*, *N. viridula*, e *L. deducta* foram registrados. Estas espécies foram selecionadas pois apresentam diferenças para essas características, as quais podem afetar a eficácia da fixação. O peso corporal foi determinado utilizando uma balança eletrônica de precisão, e as medidas corporais (largura do corpo = maior largura do pronoto; comprimento do corpo = ponta das jugas até a ponta dos hemiélitros) foram determinadas utilizando uma câmera digital (modelo Sony DSC -W215) para obtenção das fotos e análise das mesmas utilizando o software ImageJ, versão 1.47.

2.2.4 Influência do comportamento do percevejo na fixação do fio de ouro

Acredita-se que o comportamento das espécies de percevejos também possa afetar a fixação do fio de ouro. Portanto, em um primeiro teste, fêmeas adultas com cerca de 10 dias de idade não presas ao fio de ouro ($n = 15$ para cada espécie) foram liberadas individualmente em uma arena (placa de Petri de vidro com 15 centímetros de diâmetro) forrada com papel filtro (Figura 5A).

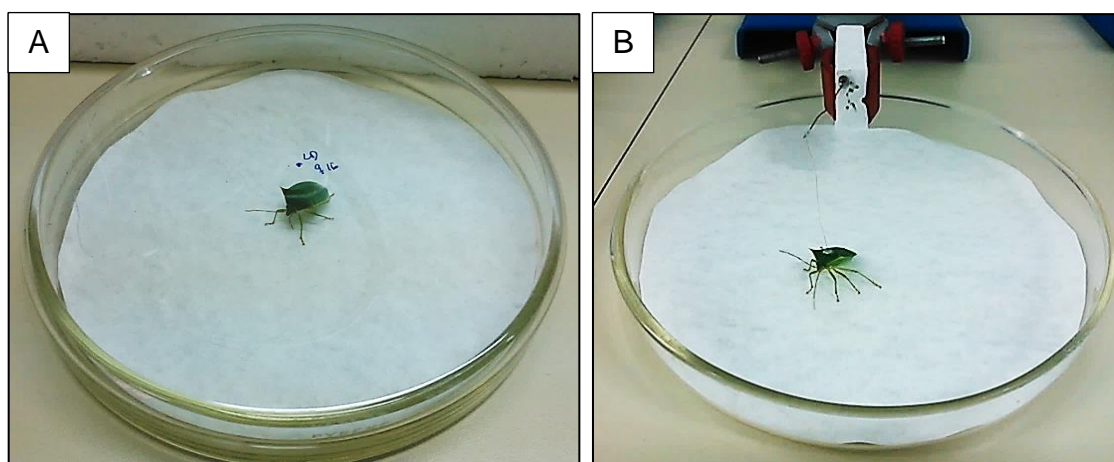


Figura 5 - Detalhe do experimento com fêmeas adultas de *Loxa deducta* mantidas em duas situações distintas para avaliação do seu comportamento. Fêmea adulta livre (não presa ao fio de ouro) e mantida individualmente em uma arena (placa de petri com 15 centímetros de diâmetro) forrada com papel filtro (A). Fêmea adulta presa ao fio de ouro e mantida individualmente em uma arena (placa de petri com 15 centímetros de diâmetro) forrada com papel filtro (B).

Os seguintes comportamentos foram avaliados: número de vezes que os percevejos se moveram, número de voltas em torno do seu próprio corpo (giro de 360°), e a distância total (cm) percorrida em 15, 30, 45 e 60 min após a liberação do percevejo no centro da arena. A distância percorrida foi determinada pela marcação do caminho no topo da arena com uma caneta, e no final de cada período de observação foi fotografada utilizando uma câmara digital (Sony modelo DSC-W215). A distância total percorrida foi então calculada analisando as fotografias utilizando o software ImageJ, versão 1.47.

Em um segundo teste, fêmeas lixadas foram presas ao fio de ouro, e o prego contendo eletrodo de cobre + fio de ouro foi cravado em um bloco de isopor fixado por garras presas a um suporte de ferro (Figura 5B). Aos percevejos foi permitido permanecer parados ou moverem-se sobre a superfície do papel colocado no fundo de uma placa de Petri com 15 centímetros de diâmetro. Os seguintes comportamentos foram avaliados: número de vezes que os percevejos se moveram, número de voltas em torno do seu próprio corpo (giro de 360°), e número de trações no fio de ouro, ou seja, número de vezes que o percevejo puxou o fio de ouro na sua extensão máxima. Os tempos de observação foram os mesmos do ensaio anterior.

2.2.5 Análise estatística

Os dados de peso corporal fresco, largura do corpo e comprimento do corpo das fêmeas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os dados de tamanho e peso da gota de cola de prata foram analisados de forma semelhante, exceto que para a comparação dos contrastes (duas médias) de percevejos lixados vs. não lixados, foi utilizado o teste t de Student. A percentagem de retenção do percevejo no fio de ouro ao longo do tempo sobre uma vagem de feijão verde, comparando insetos lixados vs. não lixados dentro de cada espécie de percevejo, foi analisada utilizando o teste do Qui-quadrado (χ^2).

Os dados sobre o efeito das atividades comportamentais na fixação do fio de ouro, das espécies de percevejos nos diferentes tempos, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa R (versão 3.1.2) (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

2.3 Resultados

2.3.1 Efeito da remoção de lipídios cuticulares, peso, tamanho corporal e tamanho da gota de cola na fixação do fio de ouro

O efeito da remoção de lipídios cuticulares sobre a percentagem de fêmeas adultas mantidas em uma vagem de feijão verde que permaneceram ligadas ao fio de ouro foi variável para as espécies de percevejos testadas ao longo do tempo (Figuras 6A-C). Os dados obtidos para os percevejos mantidos pendurados no ar não apresentaram diferenças significativas entre lixado vs. não lixado ao longo do tempo, e, portanto, não foram mostrados.

Para fêmeas de *P. guildinii*, durante todos os intervalos de tempo de avaliação, exceto para os primeiros 5 minutos, a percentagem de percevejos lixados que permaneceram presos ao fio de ouro foi significativamente maior ($P < 0,01$ em 10, 20 e 40 minutos; e $P < 0,001$ aos 80 e 960 minutos) que aqueles observados nos percevejos com pronoto não lixado. Após 960 minutos de avaliação, somente 20% dos percevejos lixados conseguiram libertar-se do fio. Por outro lado, nos percevejos não lixados, 40% deles já haviam se libertado do fio de ouro após 20 minutos de avaliação, sendo que esse valor aumentou para 75% após 960 minutos (Figura 6A). Em fêmeas de *N. viridula*, os resultados foram similares aos observados para *P. guildinii*. Dos percevejos lixados, 100% deles permaneceram anexados ao fio de ouro durante todo o período de avaliação, exceto após 960 minutos, quando esse valor diminuiu para 80%. Para os percevejos não lixados, a percentagem de retenção gradualmente diminuiu com o tempo, atingindo 20% no final do tempo de observação (Figura 6B).

Para a terceira espécie, fêmeas de *L. deducta*, uma situação diferente foi observada comparada as duas espécies previamente testadas. Nenhuma diferença significativa foi observada na percentagem de retenção do percevejo ao fio de ouro ao longo do tempo. Para ambas as condições, a percentagem de fixação no fio de ouro permaneceu elevada ($\geq 90\%$), exceto após 960 minutos, quando houve uma drástica redução para 30 e 20% em percevejos não lixados e lixados, respectivamente (Figura 6C).

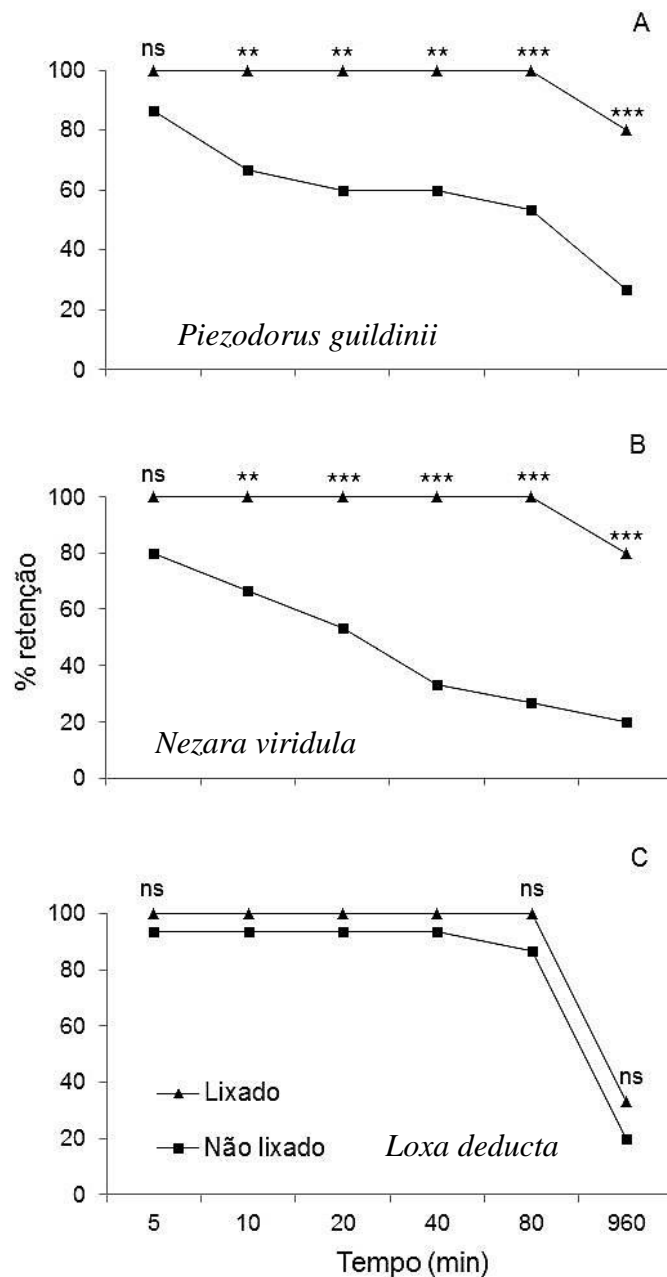


Figura 6 - Efeito da raspagem do pronoto vs. pronoto não lixado de espécies de percevejos pentatomídeos mantidos em uma vagem de feijão, sobre o número (percentagem) de indivíduos presos no fio de ouro ao longo do tempo. *Piezodorus guildinii* (A). *Nezara viridula* (B). *Loxa deducta* (C). ^{ns} não significativo; ** e *** indicam diferenças significativas a $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, usando o teste Qui-quadrado (χ^2) ($n = 15$).

O peso e as características morfológicas das diferentes espécies de percevejos anexados ao fio de ouro diferiram significativamente ($P < 0,05$). Medidas para *P. guildinii* foram as menores, enquanto *L. deducta* apresentou os maiores valores para peso fresco do corpo, largura e comprimento do corpo. *N. viridula* teve valores intermediários (Tabela 1).

Tabela 1 - Média (\pm EP) do peso fresco do corpo e características fenológicas de diferentes espécies de percevejos pentatomídeos avaliados em testes de fixação do fio de ouro para estudos com gráfico de penetração elétrica (EPG).

Espécie	Característica ¹ (n = 20)		
	Peso fresco do corpo (mg)	Largura do corpo (mm)	Comprimento do corpo (mm)
<i>Piezodorus guildinii</i>	53,1 \pm 0,35 c	9,4 \pm 0,07 c	5,1 \pm 0,04 c
<i>Nezara viridula</i>	142,7 \pm 0,55 b	14,8 \pm 0,14 b	8,4 \pm 0,10 b
<i>Loxa deducta</i>	277,8 \pm 0,99 a	17,2 \pm 0,12 a	12,9 \pm 0,08 a

¹Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey (P < 0,05).

O tamanho (diâmetro, mm) da gota de cola de prata depositada sobre o pronoto de fêmeas adultas de *N. viridula* (lixadas e não lixadas) avaliadas em diferentes intervalos de tempo, mostrou que em percevejos lixados o tamanho da gota foi significativamente maior (P < 0,05 em 0, 40 e 60; e P < 0,01 em 20 min) que aqueles depositados sobre percevejos não lixados. Entretanto, o peso da gota de cola de prata depositada sobre o percevejo nas diferentes condições (lixado e não lixado) foi similar (Tabela 2).

Tabela 2 - Média (\pm EP) do tamanho (diâmetro, mm) e do peso (mg) da gota de cola de prata, ao longo do tempo, depositada sobre o pronoto de fêmeas adultas de *Nezara viridula* lixadas e não lixadas.

Condição do pronoto	Tempo ¹ (min) (n = 10)				Peso da gota de cola de prata (n = 60)
	0	20	40	60	
Lixado	2,77* (0,05) a	2,85 ** (0,05) a	2,82* (0,05) a	2,83* (0,04) a	1,14 ^{ns} (0,03)
Não lixado	2,60 (0,05) a	2,62 (0,06) a	2,66 (0,05) a	2,66 (0,06) a	1,15 (0,04)

¹Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey (P < 0,05). ^{ns} não significativo, * e ** indicam diferenças significativas na coluna (entre lixado vs. não lixado) usando o teste *t* de student a P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

2.3.2 Comportamento do percevejo afetando a efetividade da fixação do fio de ouro

Resultados dos estudos para comparar o comportamento dos percevejos mostraram que houve diferenças entre as espécies avaliadas. Considerando o primeiro teste, quando percevejos não lixados foram liberados nas arenas, *P. guildinii* mostrou um número de movimentos significativamente maior em 15, 30, 45 e 60 minutos após sua liberação na arena, comparado com *L. deducta*. Além disso, *P. guildinii* foi também mais ativo que *N. viridula* aos 15 minutos de observação (Figura 7A).

O número de giros em torno do seu próprio eixo (360°) foi também significativamente maior (3x mais) para *P. guildinii* comparado com *N. viridula* e *L. deducta* em praticamente todos os quatro intervalos de avaliação. As duas últimas espécies mostraram um número similar de giros em torno do seu eixo (Figura 7B). A distância percorrida pelo percevejo durante os quatro períodos de observação foi similar para *N. viridula* e *P. guildinii*. A primeira espécie percorreu uma distância significativamente maior comparada a *L. deducta*, enquanto a segunda espécie andou mais que *L. deducta* aos 15 e 60 minutos de avaliação (Figura 7C).

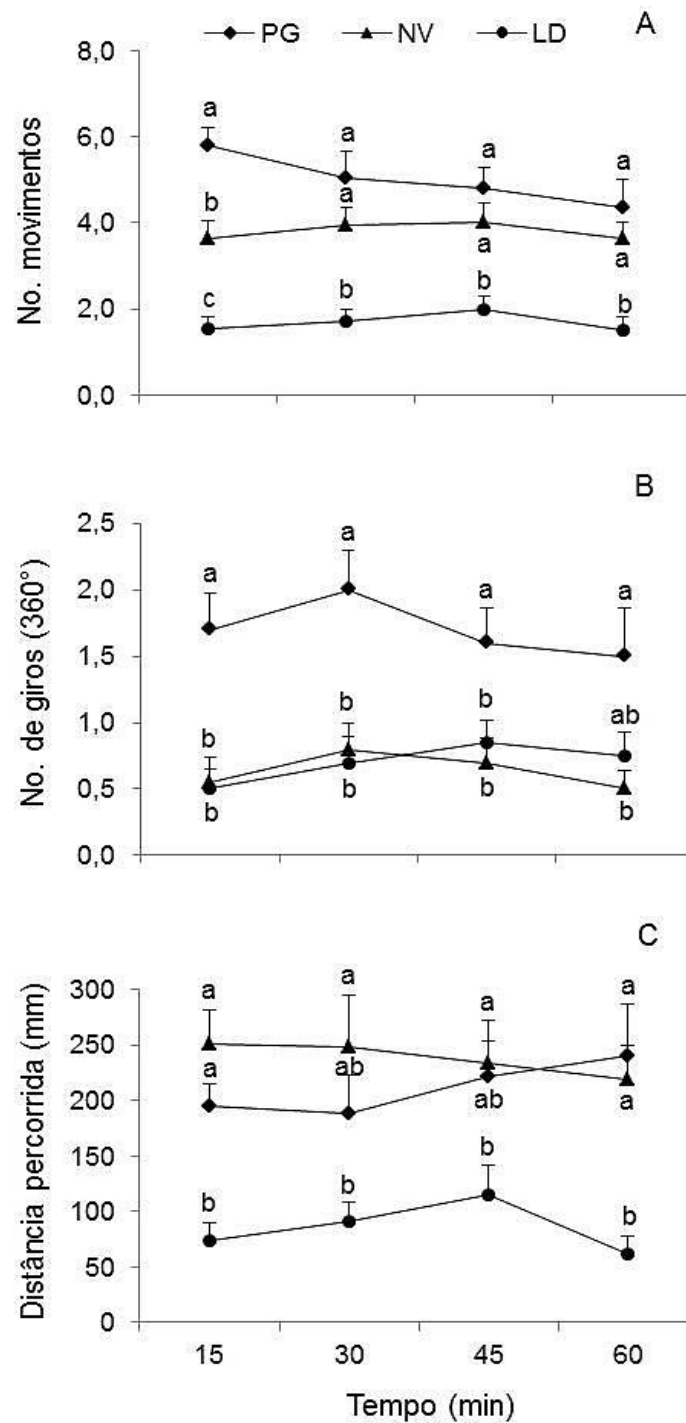


Figura 7 - Comportamento de fêmeas adultas livres (não presas no fio de ouro) de *Piezodorus guildinii* (PG), *Nezara viridula* (NV) e *Loxa deducta* (LD), ao longo do tempo, mantidas em uma arena com 15 cm de diâmetro forrada com papel filtro. Número de movimentos de um determinado ponto para outro (A). Número de giros em torno do seu próprio eixo (360°) (B). Distância total percorrida (C). Médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo intervalo de tempo não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$) ($n = 15$).

No segundo teste, quando o comportamento dos percevejos foi analisado em indivíduos presos ao fio de ouro, resultados foram, em geral, similares aos observados quando os percevejos estavam livres nas arenas. Fêmeas adultas de *P. guildinii* apresentaram um número total de movimentos significativamente maior aos 15, 30, 45 e 60 minutos comparado a *L. deducta*, e aos 15, 45 e 60 minutos comparado a *N. viridula*. Essa última espécie, entretanto, tendeu a se movimentar mais que *L. deducta*, apenas nos primeiros 15 minutos de avaliação, na qual houve diferença significativa ($P < 0,05$) (Figura 8A).

O número de giros em torno do seu próprio eixo (360°) foi significativamente ($P < 0,05$) maior para adultos de *P. guildinii* aos 15 minutos de avaliação, comparado com *N. viridula* e *L. deducta*, e após 60 minutos comparado a *N. viridula*. Essas duas últimas espécies mostraram valores similares ao longo dos quatro intervalos de avaliação (Figura 8B).

Para o número de trações no fio de ouro, ou seja, o número de vezes que o percevejo puxou o fio de ouro na sua máxima extensão, *N. viridula*, exceto aos 30 minutos de gravação, mostrou um número de trações do fio significativamente maior ($P < 0,05$) que *P. guildinii* e *L. deducta*. Essa última espécie, aos 30 e 60 minutos, mostrou um número de trações do fio significativamente maior ($P < 0,05$) que *P. guildinii*, e essa por sua vez apresentou os menores valores durante os 60 minutos de avaliação (Figura 8C).

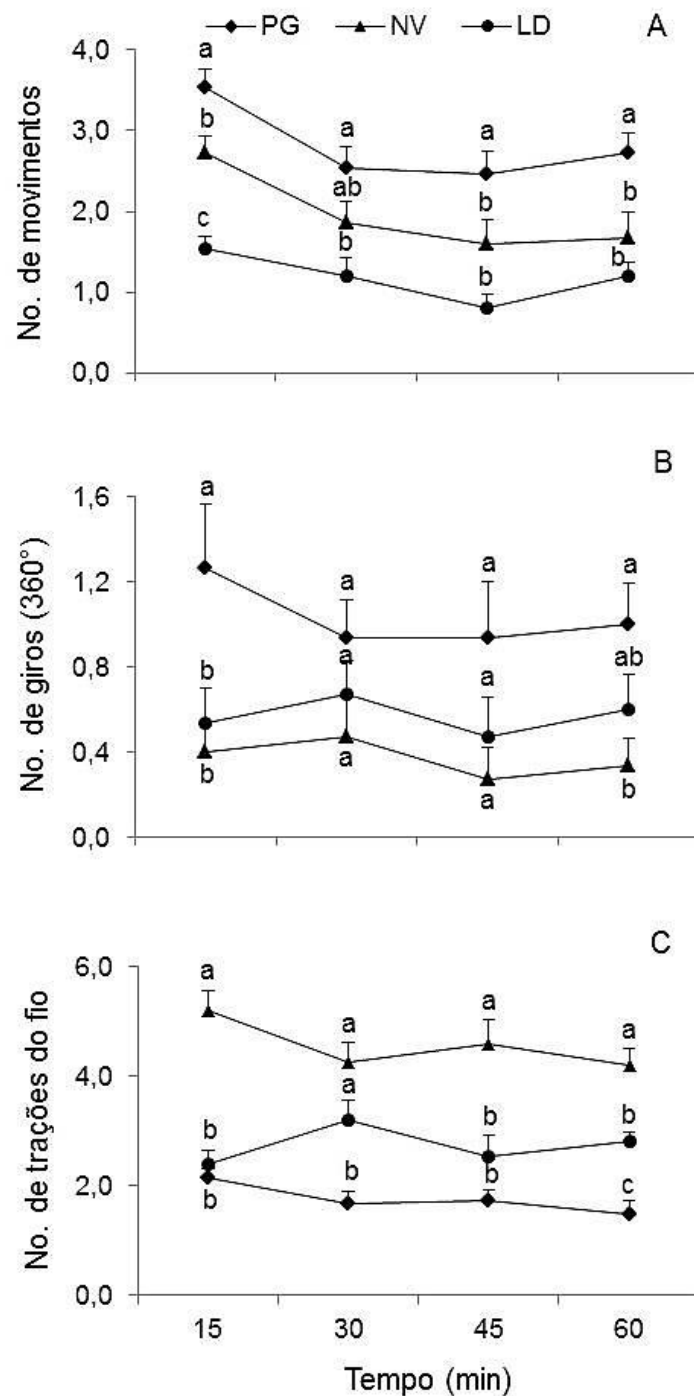


Figura 8 - Comportamento de fêmeas adultas de *Piezodorus guildinii* (PG), *Nezara viridula* (NV) e *Loxa deducta* (LD) presas no fio de ouro ao longo do tempo, e mantidas em uma arena com 15 cm de diâmetro forrada com papel filtro. Número de movimentos de um determinado ponto para outro (A). Número de giros em torno do seu próprio eixo (360°) (B). Número de trações no fio de ouro (C). Médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo intervalo de tempo não diferem significativamente entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$) ($n = 15$).

2.4 Discussão

Resultados de nossos estudos demonstraram que a remoção dos lipídios cuticulares via raspagem do pronoto, em geral, melhorou substancialmente a fixação dos percevejos pentatomídeos no fio de ouro ao longo do tempo. A técnica de raspar a cutícula do pronoto tem sido usada com sucesso para melhorar a fixação de etiquetas de monitoramento no corpo de diferentes espécies de Coleoptera (BOITEAU; COLPITTS, 2001; BOITEAU et al., 2009) e do percevejo pentatomídeo *Halyomorpha halys* (Stål) (LEE et al., 2013) usando colas de cianoacrilato.

A descoberta que o tamanho (diâmetro) da cola de prata depositada sobre o percevejo lixado foi maior que de percevejos não lixados, pode parcialmente explicar a melhor fixação do percevejo ao fio de ouro. Isso significa que a área ocupada pela cola consistentemente expandiu ao longo do tempo para um maior grau nos insetos lixados comparado aos não lixados, assim produzindo uma fixação mais segura.

Nossa descoberta adicional que *P. guildinii* e *N. viridula* apresentaram, em geral, maior mobilidade e *P. guildinii* maior número de giros em torno do seu próprio corpo, assim como *N. viridula* mostrou maior número de trações do fio, explicam a menor retenção dessas duas espécies de percevejos ao fio de ouro comparado a *L. deducta*. A frequente atividade de *P. guildinii* girar em torno do seu próprio eixo comparado com as outras duas espécies, é a causa mais provável da grande quebra da ligação do percevejo e o fio de ouro. Além disso, essa espécie de percevejo é considerada mais ativa que outros pentatomídeos fitófagos (PANIZZII; SMITH, 1977).

Dessa forma, nossa hipótese de que percevejos mais pesados e maiores se soltariam do fio mais rapidamente em comparação com percevejos mais leves e menores não foi confirmada, tanto para percevejos lixados quanto não lixados. Entretanto, nossa hipótese que atividades comportamentais, principalmente movimento corporal, por parte das espécies de percevejos causaria a quebra da ligação com o fio de ouro mais frequentemente foi suportada. O comportamento parece ser uma importante característica, mais relevante para o sucesso da fixação do percevejo ao fio de ouro que, por exemplo, o peso do corpo.

Em conclusão, nossos resultados demonstram que a raspagem do pronoto dos percevejos melhorou significativamente a fixação do fio de ouro no corpo do inseto, e que as atividades comportamentais (movimentos do corpo) das diferentes espécies de percevejos são a característica que mais influenciam a qualidade da fixação do fio de ouro.

2.5 Referências

- ALMEIDA, R.; BACKUS, E. A. Stylet penetration behaviour of *Graphocephala atropunctata* (Say): EPG waveforms characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, p. 838-851, 2004.
- BACKUS, E. A.; CLINE, A. R.; ELLERSEICK, M. R.; SERRANO, M. S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 100, p. 296-310, 2007.
- BACKUS, E. A.; HOLMES, W. J.; SCHREIBER, F.; REARDON, B. J.; WALKER, G. P. Sharpshooter X wave: Correlation of an electrical penetration graph waveform with xylem penetration supports a hypothesized mechanism for *Xylella fastidiosa* inoculation. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, p. 847-867, 2009.
- BACKUS, E. A.; RANGASAMY, M.; STAMM, M.; MCAUSLANE, H. J.; CHERRY, R. Waveform library for chinch bugs (Hemiptera: Heteroptera: Blissidae): characterization of electrical penetration graph waveforms at multiple input impedances. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, p. 524-539, 2013.
- BOITEAU, G.; COLPITTS, B. Electronic tags for the tracking of insects in flight: effect of weight on flight performance of adult Colorado potato beetles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 100, p. 187-193, 2001.
- BOITEAU, G.; MELOCHE, F.; VINCENT, C.; LESKEY, T. C. Effectiveness of glues used for harmonic radar tag attachment and impact on survival and behavior of three insect pests. **Environmental Entomology**, v. 38, p. 168-175, 2009.
- BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DAGLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, p. 35-49, 2010.
- BONJOUR, E. L.; FARGO, W. S.; WEBSTER, J. A.; RICHARDSON, P. E.; BRUSEWITZ, G. H. Probing behavior comparisons of squash bugs (Heteroptera: Coreidae) on cucurbit hosts. **Environmental Entomology**, v. 20, p. 143-149, 1991.
- CEN, Y.; YANG, C.; HOLFORD, P.; BEATTIE, G. A. C.; SPOONER-HART, R. N.; LIANG, G.; DENG, X. Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 143, p. 13-22, 2012.
- CERVANTES, F. A.; BACKUS, E. A.; GODFREY, L.; AKBAR, W.; CLARK, T. L. Characterization of an EPG waveform library for adult *Lygus lineolaris* and *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton squares. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 684-697, 2016.

CLINE, A. R.; BACKUS, E. A. Correlations among AC electronic monitoring waveforms, body postures, and stylet penetration behaviors of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). **Environmental Entomology**, v. 31, p. 538-549, 2002.

COOK, C. A.; NEAL, J. J. Feeding behavior of larvae of *Anasa tristis* (Heteroptera: Coreidae) on pumpkin and cucumber. **Environmental Entomology**, v. 28, p. 173-177, 1999.

JIN, S.; CHEN, Z. M.; BACKUS, E. A.; SUN, X. L.; XIAO, B. Characterization of EPG waveforms for the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), on tea plants and their correlation with stylet activities. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 1235-1244, 2012.

LEE, D. H.; WRIGHT, S. E.; BOITEAU, G.; VINCENT, C.; LESKEY, T. C. Effectiveness of glues for harmonic radar tag attachment on *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) and their impact on adult survivorship and mobility. **Environmental Entomology**, v. 42, p. 515-523, 2013.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa mediatubunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring pentatomids for EPG. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, p. 118-132, 2016.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Feeding behavior of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) on maize seedlings: an EPG analysis at multiple input impedances and histology correlation. **Annals of the Entomological Society of America** v. 110, *in press*, 2017.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R.; BACKUS, E. A. Characterization of an EPG waveform library for redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), on soybean plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 198-210, 2016.

MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, v. 202, p. 1358-1359, 1964.

PANIZZI, A. R.; SMITH, J. G. Biology of *Piezodorus guildinii*: Oviposition, development time, adult sex ratio and longevity. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 70, p. 35-39, 1977.

PRADO, E.; TJALLINGII, W. F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 72, p. 157-165, 1994.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

SOSA-GOMEZ, D. R.; BOUCIAS, D.G.; NATION, J. L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, p. 31-39, 1997.

STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P.; CREAMER, R. Stylet penetration behavior resulting in inoculation of beet severe curly top virus by beet leafhopper, *Circulifer tenellus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 130-137, 2009.

SUZUKI, Y.; HORI, M. Diurnal locomotion and feeding activities of two rice-ear bugs, *Trigonotylus caelestialium* and *Stenotus rubrovittatus* (Hemiptera: Heteroptera: Miridae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 49, p. 149-157, 2014.

TJALLINGII, W. F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, p. 721-730, 1978.

TJALLINGII, W. F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 177-186, 1985.

CAPÍTULO III

Caracterização das formas de onda oriundas das atividades alimentares do percevejo pentatomídeo *Edessa meditabunda* (F.) em hastes de soja por meio do monitoramento elétrico usando o EPG

3.1 Introdução

Insetos sugadores fitófagos da ordem Hemiptera apresentam elevada importância econômica, pois várias espécies são pragas de plantas cultivadas. Logo, o conhecimento das atividades alimentares desses insetos é de grande importância para se determinar o local onde o inseto insere seus estiletes e por quanto tempo os mesmos permaneceram em certo tecido vegetal, bem como as atividades realizadas nesses locais.

O grande gargalo no estudo do comportamento alimentar desses insetos é o fato das atividades alimentares ocorrerem internamente nos tecidos vegetais o que dificulta a observação direta (WALKER, 2000). Porém, McLean e Kinsey (1964) proporcionaram um grande avanço tecnológico no estudo das interações entre os insetos sugadores e suas plantas hospedeiras com a introdução do sistema de monitoramento eletrônico, denominado de EMS (*Electrical Monitoring System*), mais tarde chamado de gráfico de penetração elétrica (*Electrical Penetration Graph* - EPG) (TJALLINGII, 1985), o qual é utilizado até hoje.

O uso da técnica de EPG tem permitido detalhar o comportamento alimentar de inúmeras espécies de insetos fitófagos que apresentam aparelho bucal do tipo picador-sugador, sendo que o grande destaque são os afídeos (TJALLINGII, 1978; TJALLINGII; HOGEN ESCH, 1993), nos quais as atividades alimentares estão bem caracterizadas. Entretanto, essa técnica têm sido muito difundida nos últimos anos e várias espécies de outros grupos tiveram seu comportamento alimentar elucidado, tais como: 1) cigarrinhas (ALMEIDA; BACKUS, 2004; STAFFORD et al., 2009; CARPANE et al., 2011; JIN et al., 2012), 2) mosca-branca (JANSSEN et al., 1989; JIANG; WALKER, 2003; YIN et al., 2010), 3) cochonilhas (CALATAYUD et al., 2001; CID; FERERES, 2010), 4) psílídeos (BONANI et al., 2010; CIVOLANI et al., 2011; CEN et al., 2012; SANDANAYAKA et al., 2014), 5) tripses (KINDT et al., 2003, 2006), e 6) percevejos (COOK; NEAL, 1999; CLINE; BACKUS, 2002; BACKUS et al., 2007, 2013; SUZUKI; HORI, 2014).

Até recentemente (2015), não havia trabalhos publicados na literatura que avaliassem as atividades alimentares de percevejos da família Pentatomidae por meio da técnica de EPG, apesar da grande importância econômica das espécies dessa família. Logo, esse é um trabalho pioneiro que servirá de base para futuros estudos com percevejos, não apenas dessa família. *Edessa meditabunda* (F.), conhecido como percevejo asa-preta da soja, é considerado uma praga secundária nessa cultura no Brasil, embora seja muito abundante em áreas de soja no Rio Grande do Sul (GALILEO et al., 1977). Na Argentina é considerado uma praga chave em soja (RIZZO, 1971). Recentemente foi demonstrado que essa espécie pode causar danos significativos em sementes de soja, afetando grandemente o potencial germinativo (SILVA et al., 2012). Entretanto, *E. meditabunda* é conhecida por preferir se alimentar das estruturas vegetativas, geralmente hastes, de seus hospedeiros (ver PANIZZI et al., 2000).

Nesse trabalho foram caracterizadas as formas de onda EPG-DC gravadas durante as atividades alimentares do percevejo *E. meditabunda* em hastes de plântulas de soja. Além disso, foi realizada a correlação das diferentes formas de onda com os tecidos vegetais explorados pelo percevejo por meio das características elétricas e via estudos histológicos e também foi determinado quanto tempo o percevejo despendeu em cada atividade alimentar.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Criação dos percevejos e plantas de soja

Adultos de *E. meditabunda* foram coletados no campo da estação experimental da Embrapa Trigo em Passo Fundo, RS, Brasil (28° 15' S; 52° 24' O). Os insetos foram levados para o laboratório de entomologia da estação e colocados em caixas plásticas de criação (25 x 20 x 20 cm) (Plasvale Ltda., Gaspar, SC. Brasil), forrada com papel filtro e provida de dieta natural padrão, composta de vagens frescas de feijão verde, *Phaseolus vulgaris* L., amendoim cru em grão, *Arachis hypogaea* L., sementes maduras de soja, *Glycine max* (L.) e frutos (bagas) de ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait.

De outubro de 2013 a julho de 2014, as caixas plásticas foram mantidas em câmara climatizada (25 ± 1°C, 65 ± 5% UR, fotoperíodo 14hL:10hE). O alimento foi checado diariamente e substituído quando necessário. A colônia foi revigorada, sempre que possível, por meio da adição de novos adultos coletados no campo, e ninfas obtidas no laboratório foram criadas até atingirem o estágio adulto, reiniciando o ciclo. Sementes de soja cv. BRS

Tordilha RR foram semeadas semanalmente em copos plásticos (100 ml) os quais foram mantidos em casa de vegetação.

3.2.2 Fixação do fio de ouro no corpo dos percevejos

Fêmeas adultas de *E. meditabunda* com cerca de 10 dias foram separadas da colônia de laboratório e mantidas em jejum por um período de 18 horas antes da gravação. Em seguida, foram imobilizadas no topo de uma tampa de placa de Petri, utilizando uma fita adesiva presa na porção posterior do abdômen. As fêmeas, tiveram seu pronoto lixado de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 2. Um filamento de ouro (± 3 cm de comprimento e 0,1 mm de diâmetro) (Sigmund Cohn Corporation, Mount Vernon, NY, USA), foi colado a um eletrodo de cobre (3 cm de comprimento) que tinha sido previamente soldado a um pequeno prego de cobre. Em uma das extremidades do fio de ouro, um pequeno “looping” foi feito, com auxílio de uma pinça entomológica.

O fio de ouro foi fixado ao corpo do percevejo usando cola de prata solúvel, a qual foi produzida misturando água destilada, flocos de prata (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e cola branca (Elmer's Glue.All, Westerville, OH, USA) na proporção de 1:1:1 (V:P:V). Uma gota de cola de prata foi depositada na área lixada do pronoto, e o “looping” do fio de ouro foi mergulhado na cola, onde foi deixado secar durante 40 minutos. Depois disso, os percevejos foram libertados (a fita adesiva foi cuidadosamente removida) e permaneceram pendurados no ar por mais ou menos 10 minutos para ter certeza que o fio estava fixado ao pronoto do percevejo antes de iniciar o monitoramento das atividades alimentares.

3.2.3 Gravação das formas de onda

Após a fixação do percevejo no fio de ouro, o eletrodo (prego contendo o eletrodo de cobre + fio de ouro fixado ao percevejo) foi então conectado ao EPG *probe* (amplificador) do equipamento e o eletrodo de cobre da planta (± 3 cm de comprimento) foi inserido no solo contendo a planta de soja em estágio vegetativo - V1 (folha unifoliada de acordo com a escala de FEHR et al., 1971), assim fechando o circuito elétrico e permitindo a gravação dos dados (Figura 1).

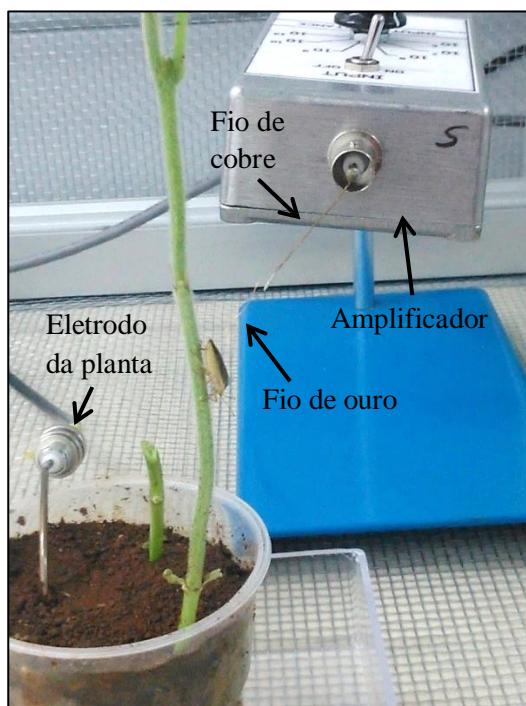


Figura 1 - Fêmea de *Edessa meditabunda* presa no fio de ouro e posicionada sobre a haste de uma plântula de soja. Prego de cobre, contendo o fio de cobre + fio de ouro, inserido no EPG *probe* (amplificador) e o eletrodo da planta inserido no solo contendo a planta de soja (estádio V1 [folha unifoliada]), fechando o circuito elétrico.

Vinte e cinco fêmeas foram gravadas com sucesso, cada uma foi gravada durante um período contínuo de 8 horas (9:00 – 17:00). As gravações de EPG foram obtidas usando um monitor DC, modelo Giga 8 (EPG systems, Wageningen, Netherlands) (TJALLINGII, 1988), com uma impedância de entrada fixa de 10^9 Ohms e ajustado para um ganho de 50x. As mudanças, principalmente de biopotenciais (ver discussão), durante as atividades dos estiletos foram amplificadas e digitalizadas a uma taxa de 100 amostras por segundo por canal usando o equipamento WinDag DI-710 (Dataq® Instruments, Akron, OH, USA) e gravado usando um laptop HP Pentium com o software WinDag Lite (Dataq) instalado. As gravações foram feitas em uma sala fechada mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com luz artificial. Os insetos, plantas e amplificadores foram mantidos dentro de uma gaiola de Faraday para reduzir as interrupções elétricas externas.

As formas de onda foram caracterizadas levando-se em consideração as formas de onda previamente obtidas para outras espécies de insetos sugadores, considerando aparência, amplitude, frequência e nível de voltagem. A amplitude mínima e máxima de cada forma de onda foram determinadas em comparação à forma de onda com a maior amplitude durante

cada evento alimentar, para isso foi considerada a diferença entre o menor vale e o maior pico, de acordo com Backus et al. (2013). Amplitude e frequência da forma de onda foram estimadas baseando-se na média de seis observações para cada inseto, totalizando cerca de 150 observações para cada forma de onda.

3.2.4 Análises histológicas dos tecidos vegetais

Correlações entre a posição dos estiletes no tecido da haste da planta de soja e as diferentes formas de onda observadas durante as gravações com EPG foram realizadas via análises histológicas. Para esse estudo, um segundo conjunto de fêmeas adultas de *E. meditabunda* foi gravado usando as mesmas condições das gravações prévias com o EPG.

Quando uma forma de onda de interesse foi observada, o monitor EPG foi desligado e os estiletes foram seccionados usando uma micro tesoura entomológica. O corte foi cuidadoso para não afetar a posição dos estiletes no tecido vegetal. Além disso, os passos para processamento das amostras foram mínimos a fim de evitar o deslocamento dos estiletes. Em seguida, um pedaço da haste de soja (~2cm) em torno do local de inserção dos estiletes foi excisado. Esse fragmento de tecido contendo os estiletes decepados foi cuidadosamente cortado à mão em finas seções usando uma lâmina de barbear (Wilkinson Sword, UK) sob um estereomicroscópio (Wild Heerbrugg, Model M5A, Switzerland).

Os cortes histológicos foram colocados separadamente em placas de Petri contendo uma solução de água: hipoclorito de sódio (10%) na proporção de 1:1 (V:V) para clarear os tecidos. Após alguns minutos, as seções foram enxaguadas em água destilada e posteriormente coradas em solução de azul de toluidina a 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) durante cinco minutos (Figura 2A). Em seguida, lâminas semipermanentes foram preparadas em gelatina glicerizada (Figura 2B).

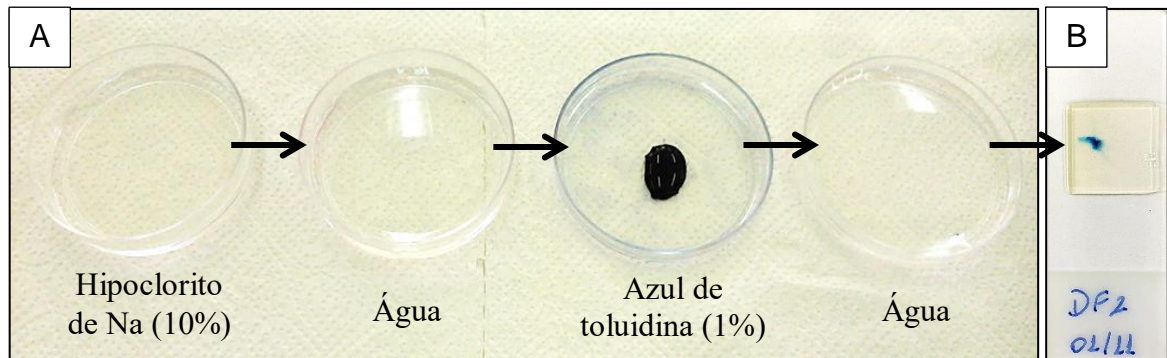


Figura 2 - Metodologia para preparação dos cortes histológicos obtidos de hastes de soja (A). Lâmina semipermanente após o preparo (B).

As lâminas foram utilizadas para determinar a posição da ponta dos estiletes e/ou da bainha salivar no tecido da haste de soja. A posição para a forma de onda Em1 foi determinada com base em três espécimes, para Em2 com oito espécimes e para Em3 com seis espécimes. Imagens digitais foram capturadas usando um microscópio Olympus BX50 (Shinjuku, Tokyo, Japan) acoplado a uma câmera de vídeo Sony DXC 107A (Minato, Tokyo, Japan) ligada a um computador.

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterização das formas de onda

Visão geral das formas de onda obtidas durante o monitoramento elétrico. Sobre hastes de plantas de soja, oito tipos diferentes de formas de onda foram gravados a partir de fêmeas adultas de *E. mediatubunda*. Essas formas de onda foram descritas de acordo com suas características (frequência, amplitude relativa e nível de voltagem), as quais estão sumarizadas na Tabela 1. Formas de onda são apresentadas nas Figuras 3, 4 e 5.

Tabela 1 - Sumário das formas de onda EPG-DC, suas principais características e atividades propostas para cada forma de onda gravada durante as atividades alimentares de *Edessa meditabunda* em hastes de plântulas de soja.

Fase	Família	Tipo	Amplitude relativa (%)	Frequência (Hz)	Nível de voltagem	Atividades biológicas propostas ^a
Não alimentação	-	Np	Elevada	Irregular	-	Caminhando sobre a superfície da planta e tocando com o rostro (lábio)
		Z	Baixo	-	-	Parado sobre a superfície da haste
Inserção e penetração dos estiletes	-	Em1	100	Irregular	Intracelular/ Extracelular	Inserção e penetração profunda dos estiletes no tecido vegetal e secreção da bainha salivar
Onda X (Transição)	-	X	25-45	4,5-7,5	Intracelular	Penetração de células do floema; salivação, egestão e teste de células
Ingestão	I	Em2	40-85	3,5-5,0	Extracelular	Ingestão de seiva do xilema
	I	Em3	5-12	5,5-8,5	Intracelular	Ingestão de seiva do floema
Interrupção	N	Em4	40-55	Irregular	Extracelular	Salivação durante ingestão nas células do xilema
	N	Em5	15-35	Irregular	Intracelular	Salivação durante ingestão nas células do floema

^a Baseado em estudos prévios realizados com outros insetos picadores sugadores (ver referências no texto).

Assim como em outros estudos com EPG, a estrutura das formas de onda foi dividida em: ondas relacionadas às atividades de não alimentação (formas de onda Np e Z), nas quais o percevejo não está com os estiletes inseridos no tecido vegetal, e formas de onda relacionadas com atividades alimentares, nesse caso o percevejo está com os estiletes inseridos no tecido vegetal. Essa última foi composta de quatro principais fases: 1) inserção e penetração dos estiletes, 2) fase de ingestão, 3) fase de interrupção e 4) fase de transição, ou seja, tipo de forma de onda gravada entre a inserção dos estiletes e ingestão, chamada forma de onda X. A fase de inserção e penetração dos estiletes apresentou um tipo de forma de onda (Em1). A fase de ingestão apresentou uma família (I) que incluiu as formas de onda Em2 e Em3, e a fase de interrupção apresentou uma família (N) que incluiu as formas de onda Em4 e Em5.

Formas de onda relacionadas às atividades de não alimentação (Np e Z). Essas formas de onda ocorreram quando o inseto não estava com os estiletes inseridos no tecido vegetal. Entre todas as formas de onda gravadas, Np foi a mais frequentemente repetida por cada inseto (61,4 vezes) com média de duração de 0,6 min por evento (o que representou 7,5% do tempo médio gasto pelo inseto durante as 8 horas de gravação). Essa forma de onda exibiu elevada amplitude e frequência irregular com muitos picos. Ela ocorreu quando o percevejo estava caminhando sobre a superfície da haste ou quando tocou a superfície da planta com seu rostro (lábio) (Tabelas 1-2, Figura 3).

A forma de onda Z exibiu amplitude relativa muito baixa com pouca variação na voltagem, e, além disso, representou a linha base da gravação. Essa onda foi gravada quando o inseto estava parado sobre a superfície da haste, e representou a maior parte do tempo gravado, cerca de 43% (Tabelas 1-2, Figura 3).

Tabela 2 - Variáveis (EPG-DC) usadas para estudar o comportamento alimentar de *Edessa meditabunda* em hastes de plântulas de soja. NPW = número de indivíduos que produziram a forma de onda. NWEI = número de vezes que a forma de onda foi produzida por inseto. WDI = duração da forma de onda por inseto (min). WDEI = duração da forma de onda por evento por inseto (min). PRT = percentagem do tempo total gravado.

Fase	Família	Tipo	NPW (n = 25)	NWEI (n = 25)	WDI (n = 25)	WDEI (n = 25)	PRT (n = 25)
				Média ± EP	Média ± EP	Média ± EP	
Não alimentação	-	Np	25	61,4 ± 5,7 (14-140)	35,9 ± 3,9 (6,9-71,7)	0,6 ± 0,1 (0,3-1,3)	7,5
		Z	25	-	206,4 ± 20,8 (37,4-417,6)	-	42,8
Inserção e penetração dos estiletes	-	Em1	25	15,1 ± 3,4 (2-71)	27,2 ± 9,0 (0,8-201,9)	1,6 ± 0,2 (0,2-5,3)	5,7
Onda X	-	X	11	0,7 ± 0,2 (0-3)	2,9 ± 0,4 (1,1-5,5)	1,9 ± 0,2 (1,1-3,6)	0,6
Ingestão	I	Em2	25	3,4 ± 0,5 (1-10)	147,3 ± 16,5 (33,3-336,0)	61,6 ± 8,1 (9,3-172,4)	30,6
	I	Em3	11	0,7 ± 0,2 (0-3)	62,0 ± 26,8 (8,2-310,7)	99,8 ± 26,1 (8,2-310,7)	12,9
Interrupção	N	Em4	8	1,4 ± 0,5 (0-8)	0,1 ± 0,07 (0,06-0,6)	0,08 ± 0,01 (0,03-0,13)	-
	N	Em5	11	43,3 ± 12,8 (5-195)	3,3 ± 1,8 (0,3-21,6)	0,07 ± 0,01 (0,04-0,11)	-

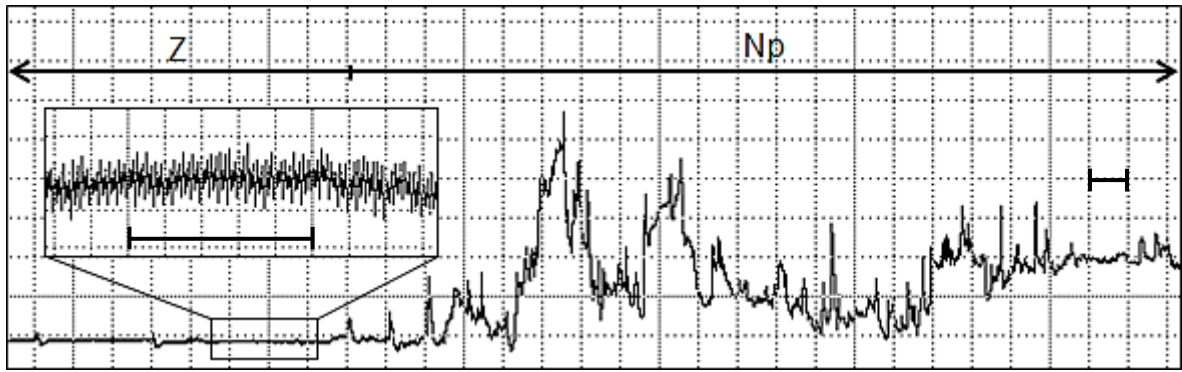


Figura 3 - Gráfico de penetração elétrica (EPG-DC), de fêmeas adultas de *Edessa meditabunda* sobre hastes de plântulas de soja, mostrando as formas de onda Z (parado) e Np (caminhando sobre/ou tocando a superfície da planta com o rostro). Caixa expandida mostra a forma de onda Z. Windaq compressão 5 [1 s/divisão vertical], ganho 4x. Caixa expandida tem compressão 1 [0,2 s/divisão vertical], ganho 128x. Barra de escala equivale a 1s.

Fase de inserção e penetração dos estiletes (Em1). Forma de onda Em1 representou o primeiro contato elétrico das peças bucais do percevejo (estiletes) com o tecido vegetal, pois essa foi à primeira forma de onda associada com atividade alimentar. Essa onda foi visualmente correlacionada com o percevejo tocando a superfície da planta com seu rostro e iniciando a penetração dos estiletes. Além disso, o dobramento do lábio combinado com movimento dos estiletes foi frequentemente observado no final de cada atividade alimentar, quando a forma de onda retornou a ser Em1 e o percevejo retirou seus estiletes do tecido vegetal, essa atividade foi frequentemente seguida pela fase de não alimentação, ou seja, formas de onda Np e Z (Figura 4D).

Em1 foi gravado em todos os insetos avaliados com uma média de 15,1 eventos por percevejo e uma duração média de 1,6 min por evento. Em1 exibiu uma frequência irregular e teve a maior amplitude relativa entre todas as formas de onda registradas. Além disso, apresentou alto nível de voltagem no início da atividade alimentar a qual gradualmente diminuiu à medida que os estiletes penetraram mais profundamente nos tecidos vegetais (Tabelas 1-2, Figuras 4B-E).

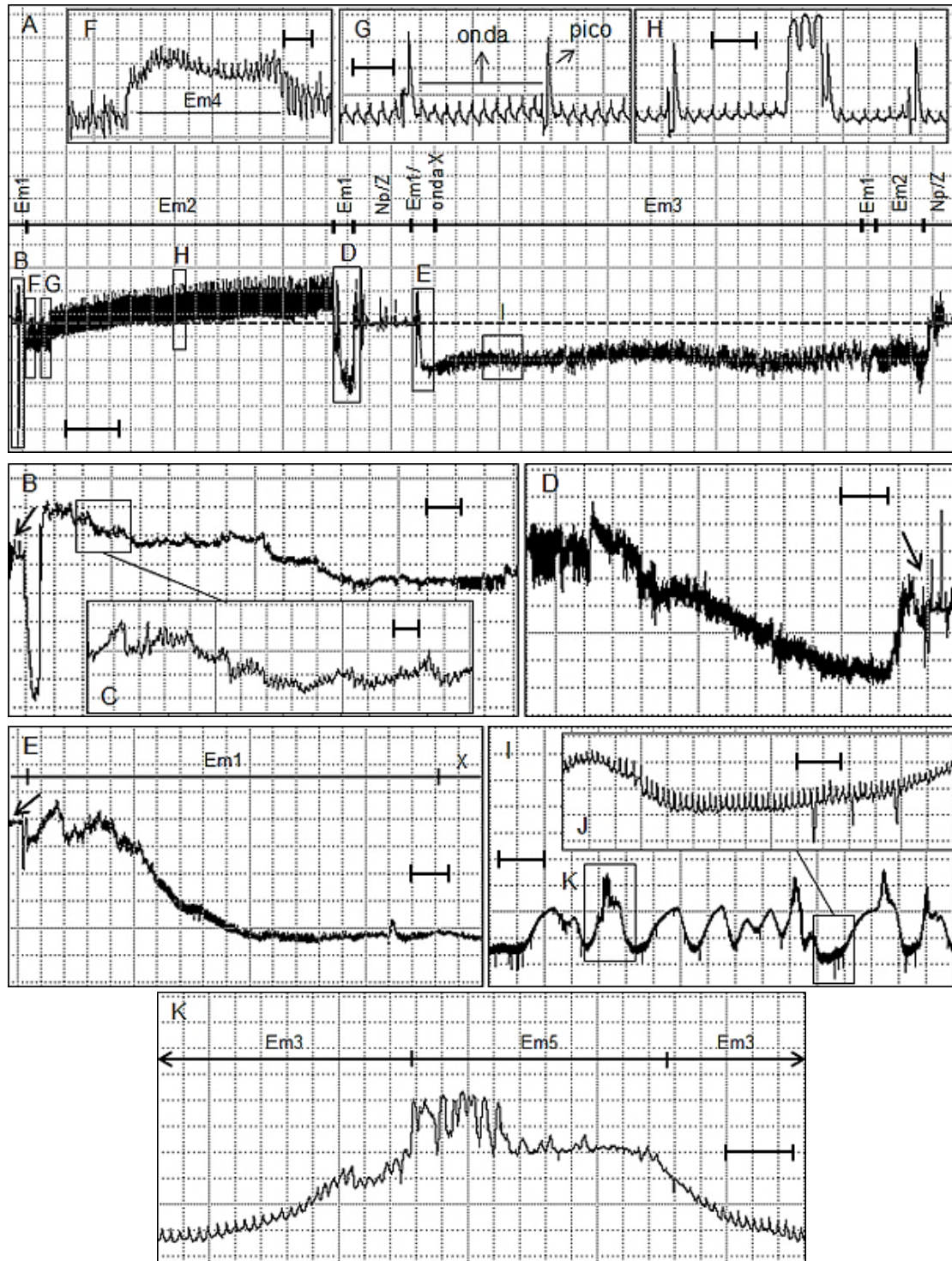


Figura 4 - Formas de onda (EPG-DC) gravadas durante o comportamento alimentar de fêmeas adultas de *Edessa meditabunda* em hastes de plântulas de soja. Visão geral de duas atividades alimentares distintas (290 min), a qual mostra atividades de não alimentação (Np e Z), inserção e penetração dos estiletes (Em1), ingestão de seiva dos vasos do xilema (Em2), a onda X, e ingestão de seiva dos vasos do floema (Em3) (A). Visualizações expandidas da forma de onda Em1 (B, C). Visualização expandida do momento que o percevejo retira os estiletes do tecido vegetal no final de sua atividade alimentar (D). Forma de onda Em1 e início da onda X (E). Visualização expandida da forma de onda Em2 (F-H). Interrupção (forma de onda Em4) durante a forma de onda Em2 (F). Definição de onda e pico (G).

Detalhe de picos mais largos observados durante a forma de onda Em2 (H). Visualizações expandidas da forma de onda Em3 (I-K). Visualização expandida da forma de onda Em3 intercalada com interrupções (forma de onda Em5) (K). Figura A tem Windaq compressão 2000 [400 s/divisão vertical]. B tem compressão 40 [8 s/divisão vertical,], ganho 2x. C tem compressão 5 [1 s/divisão vertical], ganho 8x. D tem compressão 30 [6 s/divisão vertical], ganho 4x. E tem compressão 30 [6 s/divisão vertical], ganho 4x. F tem compressão 4 [0,8 s/divisão vertical], ganho 8x. G tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho 8x. H tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho 8x. I tem compressão 30 [6 s/divisão vertical], ganho 8x. J tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho 16x. K tem compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho 16x. Setas e a linha pontilhada indicam a linha de base. Figura A = barra de escala equivale a 1000s, figuras B, D, E, I = barra de escala equivale a 10s, figuras C, F-H, J, K = barra de escala equivale a 1s.

Forma de onda X: quando presente, a forma de onda X sempre ocorreu após a forma de onda Em1, e sempre foi seguida pela forma de onda Em3 (Figura 5A). Essa onda é uma forma de onda transitória de curta duração (~2 min), e frequentemente houve um aumento gradual no nível de voltagem em direção ao fim da forma de onda X (Figura 5B). Além do mais, uma breve, mas abrupta, queda de voltagem no final da onda X foi observada (Figura 5C), o qual marca o início da forma de onda Em3 (Figuras 5D-F). A forma de onda X exibiu uma pequena porção com média amplitude e alta frequência, variando de 4,5 a 7,5 Hz (Tabela 1). Usualmente, houve apenas uma forma de onda X (evento) antes do percevejo iniciar, de forma sustentada, a forma de onda Em3 por longos períodos de tempo.

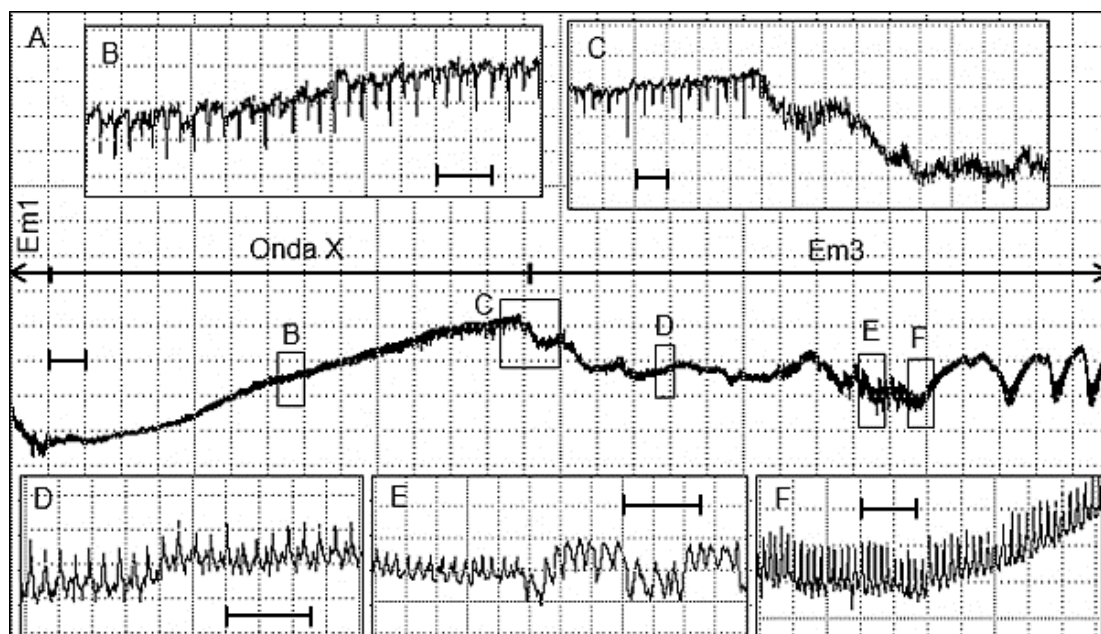


Figura 5 - Formas de onda X e Em3 gravadas durante as atividades alimentares de fêmeas adultas de *Edessa meditabunda* nos tecidos do floema de hastes de plântulas de soja (A). Expansão da forma de onda X mostrando um aumento gradual do nível de voltagem (B). Transição da forma de onda X para a forma de onda Em3 (ingestão de seiva do floema), a qual mostra uma breve e abrupta queda de voltagem (C). Expansões da forma de onda Em3, mostrando a evolução na aparência ao longo do tempo (D-F). Figura A tem Windaq compressão 50 [10 s/divisão vertical], ganho 16x. B tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho 64x. C tem compressão 5 [1 s/divisão vertical], ganho 32x. D tem compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho 64x. E tem compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho 16x. F tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho 32x. Figura A = barra de escala equivale a 10s, figuras B-F = barra de escala equivale a 1s.

Fase de ingestão. Família I (Em2 e Em3). Família I foi composta de dois tipos de formas de onda, Em2 e Em3. A forma de onda Em2 sempre ocorreu imediatamente após forma de onda Em1 sem a presença da forma de onda transitória X. Em2 foi composta de repetitivas ondas intercaladas com picos voltados para cima (definido na Figura 4G), a qual ocorreu em intervalos regulares (Figuras 4G, H). Às vezes, picos largos foram observados no topo de um platô com elevada amplitude (Figura 4H). A forma de onda Em2 exibiu alta amplitude relativa (variando de 40 a 85%), nível de voltagem extracelular (positivo), e média frequência, a qual variou de 3,5 a 5,0 Hz. Todos os insetos realizaram essa forma de onda, a qual representou a maior parte do tempo de gravação referente ao tempo gasto nas atividades alimentares (30,6%). Em2 foi repetido em média 3,4 vezes por inseto e tipicamente teve um longo período de duração, média de 61,6 min por evento (variando de 9,3 a 172,4 min) (Tabelas 1-2).

A forma de onda Em3 foi sempre precedida pela forma de onda X. Comparado com a forma de onda Em2, Em3 tem um formato irregular com aspecto sinuoso, ou seja, alternando subidas e descidas a uma frequência de 0,1 Hz (Figura 4I). Entretanto, sobreposto nessa sinuosidade há uma forma de onda muito menor, altamente regular com picos voltados para cima (Figuras 4 J, K; 5 D-F) e com frequência variando de 5,5 a 8,5 Hz.

Usualmente, a forma de onda Em3 mostrou baixa amplitude relativa (5-12%), nível de voltagem intracelular (negativo). Ela foi observada em 44% dos insetos gravados, e repetida em média menos de uma vez por inseto. Contudo, Em3 mostrou um longo período de duração, cerca de 100 min por evento (variando de 8,2 a 310,7 min), assim representou 12,9% do tempo total gravado (Tabelas 1-2).

Fase de interrupção. Família N (Em4 e Em5). Essa família compreende curtas interrupções (< 5s) que ocorreram dentro das formas de onda Em2 e Em3, porém mais frequentemente em Em3. Essa família engloba dois tipos diferentes de ondas, chamadas Em4 e Em5. A forma de onda Em4 mostrou formato irregular, alta amplitude (40 a 55%) e um platô com picos em seu topo (Figura 4F). Ela foi observada em 32% dos insetos e ocorreu apenas durante a forma de onda Em2. Em4 foi repetida em média 1,4 vezes por inseto durante curtos períodos de tempo (~5s) (Tabelas 1-2), e quando observada, foi registrada principalmente no início da onda Em2.

A forma de onda Em5 é similar à onda Em4, ou seja, curto período de duração (~4s), amplitude variando de 15 a 35%, e frequência irregular. Entretanto, Em5 frequentemente mostrou picos com maior amplitude comparada a Em3 (Figura 4K). Ao contrário de Em4, Em5 foi frequentemente repetida durante toda a forma de onda Em3 (média de 43 eventos por inseto), mas não foi repetida regularmente (Tabelas 1-2).

3.3.2 Correlações entre as formas de onda e a posição dos estiletes no tecido vegetal

A correlação entre as atividades comportamentais e as formas de onda gravadas durante o estudo com EPG foi realizado via análises histológicas dos tecidos vegetais. Durante a penetração dos estiletes de *E. mediotabunda* em direção ao local de ingestão, uma bainha salivar sempre cercou os estiletes durante todo o percurso de penetração dos estiletes (Figura 6A, linha laranja delimita a bainha salivar). Para a forma de onda Em1, todas as pontas dos estiletes decepados (n = 3) foram observadas nas células do parênquima, suportando que Em1 representa a inserção e penetração dos estiletes através desse tecido vegetal (Figura 6B).

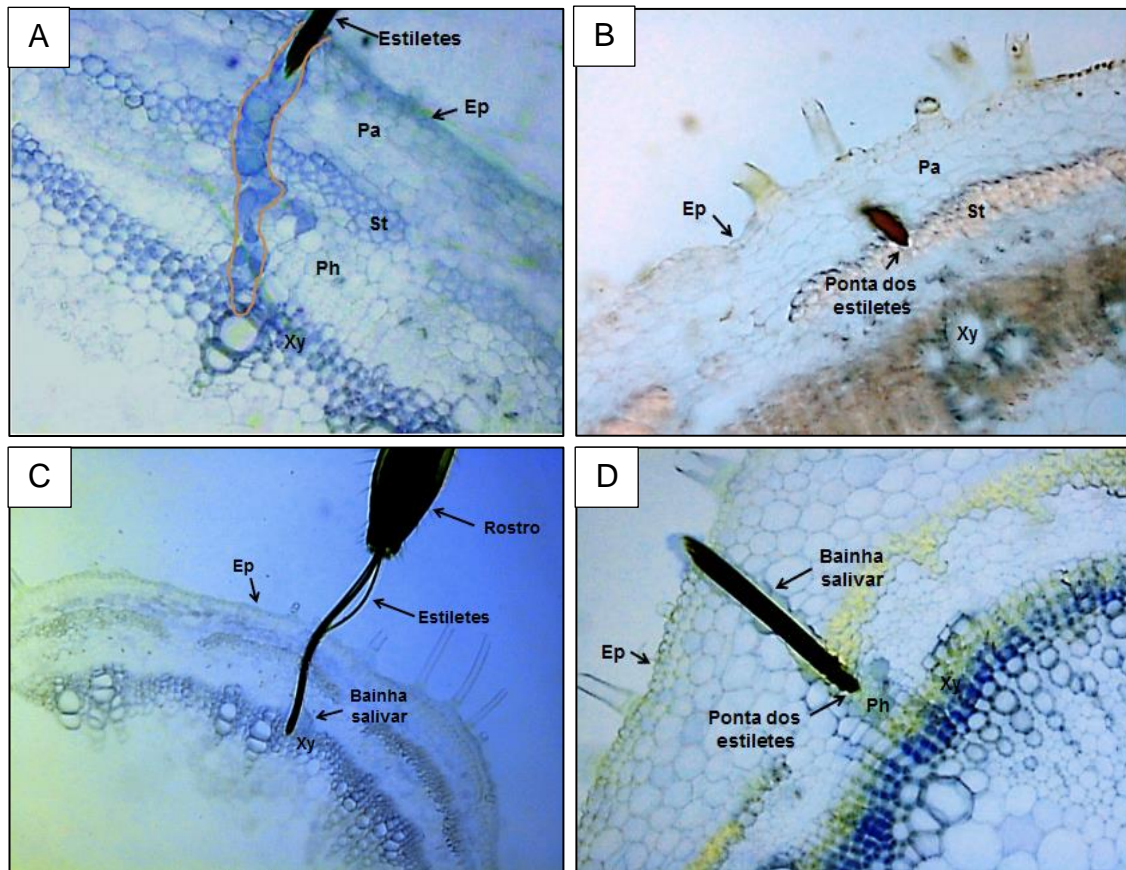


Figura 6 - Secções histológicas de hastes de plântulas de soja contendo estiletes e bainha salivar de fêmeas adultas de *Edessa mediatubunda*. Bainha salivar secretada durante a penetração dos estiletes e terminando no sítio de ingestão - xilema (A). Ponta dos estiletes terminando no tecido do parênquima durante a forma de onda Em1 (B). Detalhe da ponta dos estiletes nos tecidos do xilema durante a forma de onda Em2 (C). Detalhe da ponta dos estiletes e da bainha salivar nos vasos do floema durante a forma de onda Em3 (D). Ep = epiderme da haste, Pa = parênquima, St = esclerênquima, Ph = floema, Xy = xilema. Linha laranja desenhada na figura 6A delimita a bainha salivar.

Durante Em2, todas as secções vegetais ($n = 8$) revelaram que ambas as pontas, dos estiletes e da bainha salivar, estavam localizadas nas células do xilema (Figuras 6A, C) enquanto que para Em3, todas as pontas dos estiletes e das bainhas salivares ($n = 6$) terminaram nas células do floema (Figura 6D). Além disso, quando os estiletes de *E. mediatubunda* foram decepados durante Em3, exsudação de fluídos vegetais foram observados (Figura 7).



Figura 7 - Exsudação de conteúdo celular para o meio externo via estiletes decepados de *Edessa meditabunda* após terem sido cortados durante a ingestão de células do floema (forma de onda Em3).

3.4 Discussão

Comparado com outros insetos picadores-sugadores, tais como afídeos, mosca branca e cigarrinhas, pouco é conhecido sobre o comportamento alimentar de pentatomídeos usando a técnica de EPG. Esse é o primeiro trabalho a estudar um pentatomídeo, nesse caso *E. meditabunda*, o qual é conhecido por ser uma espécie que prefere se alimentar de hastes das plantas de soja (SILVA et al., 2012).

Foram encontradas oito diferentes formas de onda (EPG-DC) durante as atividades alimentares desse percevejo, as quais foram nomeadas de acordo com as convenções presentes na literatura: as formas de onda Np e Z foram baseadas no trabalho de Youn et al. (2011), a onda X em McLean e Kinsey (1967) e Backus et al. (2009), e as famílias N e I em Backus et al. (2005, 2013) e Miranda et al. (2009). Além disso, os tipos de formas de onda foram nomeados baseando-se nas letras iniciais do nome científico da espécie estudada e adicionado um número, como em Seo et al. (2009).

Nosso estudo usou o monitor Giga 8 EPG-DC, o qual é pré-ajustado para uma impedância de entrada de 10^9 Ohms. É possível que o uso de um monitor EPG AC-DC, que permite trabalhar com diferentes impedâncias de entrada (variando de 10^6 a 10^{13} Ohms), poderia revelar novas formas de onda para pentatomídeos. Backus et al. (2013) demonstraram que gravações de percevejos, *Blissus* spp., em 10^9 Ohms falhou em mostrar as formas de onda com predominância de R (fatores relacionados a resistência), as quais são capturadas em menores níveis de impedância de entrada.

Fase de inserção e penetração dos estiletes (Em1). A forma de onda Em1 sempre ocorreu após as atividades de não alimentação (formas de onda Np e Z), e também foi observada em todas as fêmeas de *E. mediotabunda* gravadas. Essa forma de onda sem dúvida está relacionada à penetração inicial dos estiletes internamente nos tecidos vegetais. Além do mais, durante Em1 ocorreu a secreção de saliva geleificante para criar a bainha salivar, a qual foi observada em todas as secções histológicas correlacionadas com essa forma de onda.

Em1 é similar em aparência com as formas de onda G e H observadas para os percevejos, *B. insularis* e *B. occidentalis* (Heteroptera: Blissidae) (BACKUS et al., 2013), com a forma de onda S da cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (MIRANDA et al., 2009), bem como a forma de onda C de afídeos (PRADO; TJALLINGII, 1994) e do psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (BONANI et al., 2010; CEN et al., 2012). Todas essas formas de onda foram reportadas para representar a inserção e penetração dos estiletes e secreção da bainha salivar. A ocorrência de Em1 no final de cada atividade alimentar provavelmente representa o preenchimento da bainha salivar, como reportado por Backus et al. (2009) e Miranda et al. (2009).

Fase de ingestão. Ingestão de seiva do xilema (Em2). A forma de onda Em2 está fortemente correlacionada com atividades dos estiletes nos vasos do xilema. Primeiro, nossas análises histológicas com *E. mediotabunda* demonstraram que ambos, ponta dos estiletes e da bainha salivar, terminaram nas células do xilema durante Em2. Segundo, a correlação entre Em2 e atividades no xilema é fortemente suportada por evidências elétricas, tais como nível de voltagem positivo (extracelular) e elevada amplitude da onda (BACKUS et al., 2013). Voltagem extracelular é característica da ingestão de seiva do xilema por afídeos, cigarrinhas e psíldeos (TJALLINGII, 1988; PRADO; TJALLINGII, 1994; TJALLINGII, 2006; MIRANDA et al., 2009; BONANI et al., 2010).

Em cigarrinhas que se alimentam da seiva do xilema, Dugravot et al. (2008) encontraram que a amplitude da onda é proporcional à elevação do diafragma do cibário, suportando a atividade de ingestão de seiva do xilema. Assim, a amplitude elevada da onda Em2 provavelmente esteja relacionada à necessidade do percevejo de superar a alta pressão negativa dos vasos do xilema. Além disso, nenhuma mudança no nível de voltagem foi observada durante Em2, ao contrário do que acontece quando os estiletes perfuram uma célula viva, como células do floema. Nesse último caso, o nível de voltagem geralmente é negativo em impedâncias de entrada de 10^9 Ohms.

A aparência de Em2 mostra características similares com as formas de onda H-I1 e H-I2 observadas para *B. insularis* e *B. occiduus* (BACKUS et al., 2013). Do mesmo modo, Em2 têm características similares com a forma de onda G gravada em afídeos (PRADO; TJALLINGII, 1994), em psílídeos (BONANI et al., 2010), na cochonilha *Planococcus citri* (Risso) (CID; FERERES, 2010) e na cigarrinha *Circulifer tenellus* (Baker) (STAFFORD; WALKER, 2009). Além disso, ela relembra a forma de onda O2 da cigarrinha *Orosius orientalis* (Matsumura) (TRĘBICKI et al., 2012), C2 da cigarrinha *Homalodisca vitripennis* (Takiya) (BACKUS et al., 2009) e a forma de onda PG no psílídeo *Cacopsylla pyri* (L.) (CIVOLANI et al., 2011).

Todas essas formas de onda têm sido correlacionadas com atividades de ingestão nos vasos do xilema (em um caso, uma forma de onda similar foi correlacionada com ingestão de células do mesofilo [STAFFORD; WALKER, 2009], entretanto, nossos estudos histológicos não suportam a ingestão de células do mesofilo pelo percevejo em hastes de soja). Nenhuma salivação ou outra atividade, apenas ingestão, foi correlacionada com formas de onda similares em aparência a Em2 em qualquer outra espécie de hemíptero. Assim, nós concluímos que Em2, representa atividades de ingestão dos vasos do xilema.

Todos os percevejos realizaram a forma de onda Em2, com média de 3,4 eventos por inseto e por um longo período de tempo em cada evento (até uma hora). Essa resposta está provavelmente relacionada ao período de 18 horas de jejum, o qual todos os insetos foram submetidos antes da gravação. De maneira similar, um aumento substancial da ingestão de seiva do xilema em afídeos (SPILLER et al., 1990; RAMÍREZ; NIEMEYER, 2000; POMPON et al., 2010) e psílídeos (BONANI et al., 2010) foi observado quando esses foram submetidos a um período de jejum.

De acordo com Spiller et al. (1990) e Powell e Hardie (2002), a ingestão de seiva do xilema pode ser uma estratégia usada pelo inseto para manter o balanço hídrico e evitar a desidratação. Além disso, os percevejos não tiveram a experiência de se alimentar em hastes de soja antes da gravação. Portanto, *E. meditabunda* também pode estar usando essa tática para se recuperar do trauma da fixação do fio de ouro e falta de experiência com o hospedeiro.

Contato com os tecidos do floema (onda X). Nós observamos uma forma de onda de transição de curta duração, denominada onda X, a qual sempre ocorreu antes de *E. meditabunda* iniciar a fase floemática (forma de onda Em3, ver adiante). Essas duas formas de onda sempre ocorreram na mesma sequência: a onda X sempre foi seguida pela onda Em3.

De forma semelhante, Backus et al. (2013) estudando os percevejos, *B. insularis* e *B. occiduus*, observaram a presença de uma fase curta, chamada de onda J, a qual sempre ocorreu antes do percevejo iniciar a fase floemática. A onda J dos percevejos blissídeos é pensada para ser uma onda X, a qual é análoga a ondas X gravadas em afídeos e cigarrinhas (BACKUS et al., 2009). Do mesmo modo, nós hipotetizamos que a forma de onda gravada em *E. meditabunda* é uma onda X, e nomeada de acordo.

Ondas X são do tipo espécie-específica, com padrões estereotípicos de transição (formas de onda) que têm sido correlacionados com a penetração dos estiletes e posteriores atividades dentro do tecido preferido de ingestão. Isso é pensado para ocorrer em qualquer inseto picador-sugador que se alimenta de tecidos vasculares usando a estratégia da bainha salivar. Esses padrões (ondas) são uma forte indicação de penetração e atividades dos estiletes em células do floema realizadas por espécies que preferem esse tecido vegetal (WAYADANDE; NAULT, 1993; CARPANE et al., 2011; BACKUS et al., 2013), ou em células do xilema por espécies que preferem esse tecido, como cigarrinhas (BACKUS et al., 2009).

De acordo com esses últimos autores, ondas X representam uma combinação de salivação, ingestão de fluídos e egestão. Consequentemente, a presença de uma onda X suporta (junto com nossas análises histológicas) que *E. meditabunda* usa a estratégia da bainha salivar para se alimentar em hastes de soja.

Interessante, nossa onda X relembra a onda X de percevejos blissídeos quando as gravações foram realizadas usando impedância de entrada de 10^9 Ohms (o mesmo nível fixado no monitor Giga 8, o qual nós usamos). A onda X dos blissídeos foi menos nítida em aparência quando gravada em menores impedâncias de entrada (BACKUS et al., 2013). Nós suspeitamos que uma mudança similar poderia ocorrer com a onda X de *E. meditabunda*, se fosse gravado usando um monitor AC-DC em menores níveis de impedâncias (BACKUS; BENNETT, 2009).

Fase de ingestão. Ingestão de seiva do floema (Em3). A forma de onda Em3 representa as atividades nos tecidos do floema, provavelmente nos elementos crivados do floema. Para os percevejos *B. insularis* e *B. occiduus* a salivação e a ingestão nesse tecido foram nomeadas J-I1 e J-I2, respectivamente (BACKUS et al., 2013). A amplitude dessas formas de onda variou de 5 a 10%, frequência de 6,5 a 9,0 Hz e nível de voltagem intracelular quando aplicada uma impedância de entrada de 10^9 Ohms. Esses dados são similares aos observados para a forma

de onda Em3 de *E. meditabunda* na mesma impedância de entrada, na qual a amplitude variou de 5 a 12%, frequência de 5,5 a 8,5 Hz e voltagem intracelular.

Além disso, a forma de onda Em3 apresenta características similares as formas de onda E1 e E2 de afídeos (PRADO; TJALLINGII, 1994) e dos psílídeos *D. citri* (BONANI et al., 2010) e *Bactericera cockerelli* (Sulc) (PEARSON et al., 2014), bem como as ondas PE1 e PE2 do psílídeo *C. pyri* (CIVOLANI et al., 2011), ondas D2 e D3 da cigarrinha *C. tenellus* (STAFFORD; WALKER, 2009) e ondas E(pd)1 e E(pd)2 na mosca branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (JIANG et al., 1999).

A correlação entre a forma de onda Em3 com atividades no floema é suportado por: 1) todas as secções histológicas exibiram a ponta dos estiletes e/ou da bainha salivar terminando nos tecidos do floema durante Em3. 2) nível de voltagem negativo (intracelular) dentro das células vivas dos elementos crivados, como ocorre em outros insetos, tais como afídeos (PRADO; TJALLINGII, 1994), psílídeos (BONANI et al., 2010; CEN et al., 2012), e mosca branca (JIANG et al., 1999; YIN et al., 2010). 3) baixa amplitude relativa de Em3, sugerindo uma menor força para succionar a seiva dos tecidos, ou seja, uma ingestão passiva (BACKUS et al., 2013). Uma menor força é necessária, pois a seiva do floema está sob uma pressão hidrostática interna muito alta (positiva), a qual induz a exsudação de conteúdo do floema quando esse é danificado (TAIZ; ZEIGER, 2004).

De fato, quando alguns percevejos tiveram sua atividade alimentar interrompida artificialmente durante a forma de onda Em3 e tiveram seus estiletes seccionados, houve a exsudação de fluídos, demonstrando a pressão positiva como discutido acima. Essa mesma atividade foi observada por Seo et al. (2009) para a cigarrinha *Nilaparvata lugens* (Stål), quando seus estiletes foram cortados durante a forma de onda N4-b (ingestão de seiva do floema). Todas as evidências acima suportam que Em3 representa a ingestão de seiva do floema.

A fase floemática de muitos insetos picadores-sugadores frequentemente é composta de duas formas de onda distintas correlacionadas com salivação e ingestão de seiva nos elementos crivados. Por exemplo, em afídeos a salivação e a ingestão de seiva do floema são chamadas de E1 e E2, respectivamente. Em contraste, dois tipos distintos de formas de onda não puderam ser claramente distinguidos no percevejo *E. meditabunda*. Sendo assim, ou a salivação, 1) não ocorre precedendo a ingestão em percevejos, ou 2) ocorre simultaneamente e combinado na mesma forma de onda (Em3), ou 3) está restrita apenas a breves interrupções (ver abaixo) que ocorrem durante Em3.

Os presentes resultados não podem distinguir entre essas três possibilidades e mais estudos são necessários para melhor elucidar essa incerteza. Apesar de E2 ser chamado de “ingestão no floema” para afídeos, é pensado que durante essa forma de onda ocorre simultaneamente a salivação (TJALLINGII, 2006). Portanto, iremos designar por enquanto Em3 como ingestão de seiva do floema.

Finalmente, o padrão de sinuosidade de Em3 possivelmente seja similar às mudanças sinuosas no nível de voltagem da forma de onda E2 de afídeos, recentemente encontrado, e pode ser causado pela despolarização da membrana das células dos elementos crivados pela transdução de sinal que transmite informações sobre o dano na planta (SALVADOR-RECATALÀ et al., 2014). Em outras palavras, os estiletes do inseto podem estar agindo como um eletrodo eletrofisiológico para pegar sinais derivados da planta que são sobrepostos nos sinais de ingestão derivados do inseto.

Fase de interrupção. Injeção de saliva dentro dos tecidos do xilema e floema (Em4 e Em5). Nós observamos a ocorrência de breves interrupções durante ambas às formas de onda associadas com xilema e floema. Durante a ingestão de seiva do xilema (Em2), 32% dos percevejos gravados exibiram essas interrupções, o qual foi nomeado forma de onda Em4, e em 100% dos percevejos durante ingestão de seiva do floema (Em3), a qual foi chamada de Em5. A forma de onda Em4 é similar a outras formas de onda de interrupção no xilema discutidas na literatura, chamadas de ondas N. Por exemplo, como as descritas durante a ingestão das cigarrinhas *Homalodisca coagulata* (Say) (BACKUS et al., 2005) e *B. xanthophis* (MIRANDA et al., 2009), e a também para os percevejos *B. insularis* e *B. occiduus* (BACKUS et al., 2013).

De acordo com Backus et al. (2005, 2013) as interrupções podem representar a liberação de saliva aquosa e teste de células do xilema. Essas respostas foram correlacionadas via estudos histológicos das interrupções da cigarrinha *H. vitripennis* (Takiya) (renomeada *H. coagulata*) (BACKUS et al., 2012).

Nós propomos que as interrupções (Em4) observadas durante a ingestão de seiva do xilema realizada por *E. meditabunda* também podem estar relacionadas com a secreção de saliva e teste de células desse tecido, uma vez que essa forma de onda, quando gravada, ocorreu principalmente no início da ingestão no xilema. Além disso, nenhuma interrupção foi gravada durante a ingestão de seiva do floema para os percevejos blissídeos, onde de acordo com Backus et al. (2013), a ausência da forma de onda N nesse tecido pode indicar que ocorre apenas uma única forma de onda de salivação nos elementos crivados que é a onda J-II. Para

E. meditabunda, é possível que Em5 represente o único comportamento de salivação nos vasos do floema, o qual é intercalado com períodos de ingestão (Em3), ao invés de ser apenas no início da fase floemática como em afídeos.

Em conclusão, nossos resultados demonstram que *E. meditabunda* ao se alimentar em hastes de plântulas de soja produziu oito formas de onda diferentes, as quais foram caracterizadas eletronicamente e correlacionadas via estudos histológicos. *E. meditabunda* em contraste com outros pentatomídeos pragas da soja, prefere se alimentar em hastes ao invés de vagens (SILVA et al., 2012).

Baseado nas características elétricas e em estudos histológicos, nós encontramos evidências que, pelo menos, sobre hastes de soja, *E. meditabunda* utiliza a bainha salivar como estratégia de alimentação e que a ingestão ocorre em ambos os tecidos vasculares, xilema e floema. Nossas descobertas mostram que a forma de onda Em2, que representa a ingestão de seiva do xilema, foi uma das mais dominantes durante a gravação. Entretanto, até o momento é desconhecido se isso representa a preferência do percevejo pela ingestão do xilema ao invés do floema, ou isso é resultado do estresse ocasionado pelo longo período de jejum, fixação no fio de ouro, e falta de experiência em se alimentar em hastes de soja. A caracterização de oito formas de onda (EPG-DC) de *E. meditabunda* servirá de base para futuros estudos da alimentação de outros importantes percevejos pentatomídeos pragas.

3.5 Referências

ALMEIDA, R.; BACKUS, E. A. Stylet penetration behaviours of *Graphocephala atropunctata* (Say): EPG waveforms characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, p. 838-851, 2004.

BACKUS, E. A.; ANDREWS, K. B.; SHUGART, H. J.; GREVE, L. C.; LABAVITCH, J. M.; ALHADDAD, H. Salivary enzymes are injected into xylem by the glassy-winged sharpshooter, a vector of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 949-959, 2012.

BACKUS, E. A.; BENNETT, W. H. The AC-DC Correlation Monitor: new EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing-sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 869-884, 2009.

BACKUS, E. A.; CLINE, A. R.; ELLERSEICK, M. R.; SERRANO, M. S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 100, p. 296-310, 2007.

BACKUS, E. A.; HABIBI, J.; YAN, F.; ELLERSIECK, M. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implications for transmission of *Xylella fastidiosa*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, p. 787-813, 2005.

BACKUS, E. A.; HOLMES, W. J.; SCHREIBER, F.; REARDON, B. J.; WALKER, G. P. Sharpshooter X wave: Correlation of an electrical penetration graph waveform with xylem penetration supports a hypothesized mechanism for *Xylella fastidiosa* inoculation. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, p. 847-867, 2009.

BACKUS, E. A.; RANGASAMY, M.; STAMM, M.; MCAUSLANE, H. J.; CHERRY, R. Waveform library for chinch bugs (Hemiptera: Heteroptera: Blissidae): characterization of electrical penetration graph waveforms at multiple input impedances. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, p. 524-539, 2013.

BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DAGLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, p. 35-49, 2010.

CALATAYUD, P. A.; SELIGMANN, C. D.; POLANIA, M. A.; BELLOTTI, A. C. Influence of parasitism by encyrtid parasitoids on the feeding behaviour of the cassava mealybug *Phenacoccus herreni*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 98, p. 271-278, 2001.

CARPANE, P.; WAYADANDE, A.; BACKUS, E.; DOLEZAL, W.; FLETCHER, J. Characterization and correlation of new electrical penetration graph waveforms for the corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, p. 515-525, 2011.

CEN, Y.; YANG, C.; HOLFORD, P.; BEATTIE, G. A. C.; SPOONER-HART, R. N.; LIANG, G.; DENG, X. Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 143, p. 13-22, 2012.

CID, M.; FERERES, A. Characterization of the probing and feeding behavior of *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) on grapevine. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, p. 404-417, 2010.

CIVOLANI, S.; LEIS, M.; GRANDI, G.; GARZO, E.; PASQUALINI, E.; MUSACCHI, S.; CHICCA, M.; CASTALDELLI, G.; ROSSI, R.; TJALLINGII, W. F. Stylet penetration of *Cacopsylla pyri*: an electrical penetration graph (EPG) study. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 1407-1419, 2011.

CLINE, A. R.; BACKUS, E. A. Correlations among AC electronic monitoring waveforms, body postures, and stylet penetration behaviors of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). **Environmental Entomology**, v. 31, p. 538-549, 2002.

COOK, C. A.; NEAL, J. J. Feeding behavior of larvae of *Anasa tristis* (Heteroptera: Coreidae) on pumpkin and cucumber. **Environmental Entomology**, v. 28, p. 173-177, 1999.

DUGRAVOT, S.; BACKUS, E. A.; REARDON, B. J.; MILLER, T. A. Correlations of cibarial muscle activities of *Homalodisca* spp, sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) with EPG ingestion waveform and excretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 1467-1478, 2008.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v. 11, p. 929-930, 1971.

GALILEO, M. H. M.; GASTAL, H. A. O.; GRAZIA, J. Levantamento populacional de Pentatomidae (Hemiptera) em cultura de soja (*Glycine max* L. Merr.) no município de Guaíba, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 37, p. 111-120, 1977.

JANSSEN, J. A. M.; TJALLINGII, W. F.; VAN LENTEREN, J. C. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 52, p. 69-81, 1989.

JIANG, Y. X.; LEI, H.; COLLAR, J. L.; MARTÍN, B.; MUÑIZ, M.; FERERES, A. Probing and feeding behavior of two distinct biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 357-366, 1999.

JIANG, Y. X.; WALKER, G. P. Electrical penetration graphs of the nymphal stage of *Bemisia argentifolii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 109, p. 101-111, 2003.

JIN, S.; CHEN, Z. M.; BACKUS, E. A.; SUN, X. L.; XIAO, B. Characterization of EPG waveforms for the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), on tea plants and their correlation with stylet activities. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 1235-1244, 2012.

KINDT, F.; JOOSTEN, N. N.; PETERS, D.; TJALLINGII, W. F. Characterization of the feeding behaviour of western flower thrips in terms of electrical penetration graph (EPG) waveforms. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 183-191, 2003.

KINDT, F.; JOOSTEN, N. N.; PETERS, D.; TJALLINGII, W. F. Electrical penetration graphs of thrips revised: Combining DC-and AC-EPG signals. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 1-10, 2006.

MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, v. 202, p. 1358-1359, 1964.

MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. Probing behavior of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. I. Definitive correlation of electronically recorded waveforms with aphid probing activities. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 60, p. 400-405, 1967.

MIRANDA, M. P.; FERERES, A.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of *Bucephalagonia xanthophis*, a vector of *Xylella fastidiosa* in citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 35-46, 2009.

PANIZZI, A. R.; MCPHERSON, J. E.; JAMES, D. G.; JAVAHERY, M.; MCPHERSON, R. M. Economic importance of stink bugs (Pentatomidae), pp. 421- 474. In: SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R. (Eds.). **Heteroptera of Economic Importance**. Boca Raton, CRC Press, 828 p, 2000.

PEARSON, C. C.; BACKUS, E. A.; SHUGART, H. J.; MUNYANEZA, J. E. Characterization and correlation of EPG waveforms of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioizidae): variability in waveform appearance in relation to applied signal. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, p. 650-666, 2014.

POMPON, J.; QUIRING, D.; GIORDANENGO, P.; PELLETIER, Y. Role of xylem consumption on osmoregulation in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 610-615, 2010.

POWELL, G.; HARDIE, J. Xylem ingestion by winged aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 104, p. 103-108, 2002

PRADO, E.; TJALLINGII, W. F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 72, p. 157-165, 1994.

RAMÍREZ, C. C.; NIEMEYER, H. M. The influence of previous experience and starvation on aphid feeding behavior. **Journal of Insect Behavior**, v. 13, p. 699-709, 2000.

RIZZO, H. F. E. Aspectos morfológicos y biológicos de *Edessa meditabunda* (F.). **Revista Peruana de Entomologia**, v. 14, p. 272-281, 1971.

SALVADOR-RECATALÀ, V.; TJALLINGII, W. F.; FARMER, E. E. Real time, *in vivo* intracellular recordings of caterpillar-induced depolarization waves in sieve elements using aphid electrodes. **New Phytologist**, v. 203, p. 674-684, 2014.

SANDANAYAKA, W. R. M.; MORENO, A.; TOOMAN, L. K.; PAGE-WEIR, N. E. M.; FERERES, A. Stylet penetration activities linked to the acquisition and inoculation of *Candidatus Liberibacter solanacearum* by its vector tomato potato psyllid. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 151, p. 170-181, 2014.

SEO, B. Y.; KNOW, Y. H.; JUNG, J. K.; KIM, G. H. Electrical penetration graphic waveforms in relation to the actual positions of the stylet tips of *Nilaparvata lugens* in rice tissue. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 12, p. 89-95, 2009.

SILVA, F. A. C.; SILVA, J. J.; DEPIERI, R. A.; PANIZZI, A. R. Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa meditabunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 386-390, 2012.

SPILLER, N. J.; KOENDERS, L.; TJALLINGII, W. F. Xylem ingestion by aphids - a strategy for maintaining water balance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 55, p. 101-104, 1990.

STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P. Characterization and correlation of DC electrical penetration graph waveforms with feeding behavior of beet leafhopper, *Circulifer tenellus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 113-129, 2009.

STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P.; CREAMER, R. Stylet penetration behavior resulting in inoculation of beet severe curly top virus by beet leafhopper, *Circulifer tenellus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 130-137, 2009.

SUZUKI, Y.; HORI, M. Diurnal locomotion and feeding activities of two rice-ear bugs, *Trigonotylus caelestialium* and *Stenotus rubrovittatus* (Hemiptera: Heteroptera: Miridae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 49, p. 149-157, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates Inc., Publishers, Sunderland MA, 690 p, 2004

TJALLINGII, W. F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, p. 721-730, 1978.

TJALLINGII, W. F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 177-186, 1985.

TJALLINGII, W. F. Electrical recording of stylet penetration activities, pp. 95-108. In: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Eds.). **World crop pests: Aphids, their biology, natural enemies and control**. Amsterdam, Elsevier, v. 2B, 382 p, 1988.

TJALLINGII, W. F. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 739-745, 2006.

TJALLINGII, W. F.; HOGEN ESCH, T. Fine structure of the stylet route in plant tissues by some aphids. **Physiological Entomology**, v. 18, p. 317-328, 1993.

TRĘBICKI, P.; TJALLINGII, W. F.; HARDING, R. M.; RODONI, B. C.; POWELL, K. S. EPG monitoring of the probing behaviour of the common brown leafhopper *Orosius orientalis* on artificial diet and selected host plants. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 6, p. 405-415, 2012.

WALKER, G. P. A beginner's guide to electronic monitoring of homopteran probing behavior, pp. 14-40. In: WALKER, G. P.; BACKUS, E. A. (Eds.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. Entomological Society of America, Lanham, Academic Press, 260 p, 2000.

WAYADANDE, A. C.; NAULT, L. R. Leafhopper probing behavior associated with maize chlorotic dwarf virus transmission to maize. **Phytopathology**, v. 83, v. 522-526, 1993.

YIN, H. D.; WANG, X. Y.; XUEL, K.; HUANG, C. H.; WANG, R. J.; YAN, F. M.; XU, C. R. Impacts of transgenic Bt cotton on the stylet penetration behaviors of *Bemisia tabaci* biotype B: Evidence from laboratory experiments. **Insect Science**, v. 17, p. 344-352, 2010.

YOUN, Y.; BACKUS, E. A.; SERIKAWA, R. H.; STELINSKI, L. L. Correlation of an electrical penetration graph waveform with walking by Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 94, p. 1084-1087, 2011.

CAPÍTULO IV

Caracterização das formas de onda gravadas durante o monitoramento das atividades alimentares do percevejo verde pequeno *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) em plantas de soja

4.1 Introdução

O percevejo *Piezodorus guildinii* (Westwood) conhecido como percevejo verde pequeno é o principal inseto praga da cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merrill, nas Américas (PANIZZI; SLANSKY, 1985a). Nos últimos anos tem havido um aumento significativo de sua abundância na região sul dos Estados Unidos (BAUR; BALDWIN, 2006; KAMMINGA et al., 2012), e é reportado como a espécie de percevejo predominante em lavouras de soja na Costa Superior do Golfo do Texas (VYAVHARE et al., 2014).

A biologia de *P. guildinii* e o dano decorrente de sua alimentação têm sido investigados exaustivamente por muitos anos (por exemplo, PANIZZI, SMITH, 1977; PANIZZI, SLANKSY, 1985b; CÔRREA-FERREIRA; AZEVEDO, 2002). Mais recentemente, tem sido demonstrado que essa espécie é a mais danosa entre as várias espécies de percevejos pragas de soja, devido à provável maceração dos tecidos das sementes (endosperma) causada pela ação de enzimas liberadas pelo percevejo durante suas atividades alimentares (DEPIERI; PANIZZI, 2011). Entretanto, não há evidências concretas da ocorrência de maceramento (chamada de ruptura celular) durante as atividades alimentares de *P. guildinii*.

Estudos detalhados para elucidar o comportamento alimentar de percevejos (Hemiptera: Heteroptera) são grandemente necessários, não apenas para entender a natureza do dano causada por esses insetos na cultura da soja, mas também para auxiliar no desenvolvimento de variedades resistentes. O método mais rigoroso para estudar a alimentação de hemípteros é por meio do uso da técnica do gráfico de penetração elétrica (MCLEAN; KINSEY, 1964; TJALLINGII, 1978), também conhecido como eletropenetrografia (ambos abreviados EPG).

Os poucos estudos empregando EPG em heterópteros incluem, espécies da família Miridae (CLINE; BACKUS, 2002; BACKUS et al., 2007; CERVANTES et al., 2016), Coreidae (BONJOUR et al., 1991; COOK; NEAL, 1999), e Blissidae (BACKUS et al., 2013;

RANGASAMY et al., 2015). Para pentatomídeos, antes da publicação desse trabalho, havia apenas um trabalho publicado sobre o monitoramento alimentar aplicando EPG, o qual caracterizou as formas de onda e as correlacionou com os locais específicos durante a alimentação do percevejo *Edessa meditabunda* (F.) em hastes de plântulas de soja (LUCINI; PANIZZI, 2016). Contudo, esse estudo utilizou um monitor EPG-DC, o qual apresenta certas limitações para gravar as atividades alimentares de insetos grandes (BACKUS; BENNETT, 2009).

Nesse estudo, nós gravamos o comportamento alimentar de um percevejo pentatomídeo pela primeira vez utilizando o novo monitor EPG AC-DC, produzindo a primeira biblioteca de formas de onda, a qual define o seu comportamento alimentar. O comportamento alimentar de *P. guildinii* foi registrado em três diferentes estruturas da planta de soja (fóliolo, haste e vagem). A biblioteca de ondas nos permitiu hipotetizar os significados biológicos das diferentes formas de onda registradas, as quais provavelmente estão relacionadas com salivação, ingestão do alimento, e breves interrupções. Finalmente, análises histológicas foram feitas para correlacionar os sítios e as atividades alimentares no tecido vegetal com as diferentes formas de onda.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Criação dos percevejos e plantas de soja

Colônias de *P. guildinii* foram estabelecidas no laboratório de entomologia da estação experimental da Embrapa Trigo em Passo Fundo, RS, Brasil (28° 15' S; 52° 24' O). Os insetos foram coletados no campo experimental, levados para o laboratório e colocados em caixas plásticas de criação (25 x 20 x 20 cm) (Plasvale Ltda., Gaspar, SC. Brasil), forrada com papel filtro e provida de dieta natural padrão, composta de vagens frescas de feijão verde, *Phaseolus vulgaris* L., amendoim cru em grão, *Arachis hypogaea* L., sementes maduras de soja, *Glycine max* (L.), frutos (bagas) de ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait, e vagens frescas de soja.

De janeiro de 2015 a maio de 2015, as caixas plásticas foram mantidas em câmara climatizada (25 ± 1°C, 65 ± 5% UR, fotoperíodo 14hL:10hE). O alimento foi checado diariamente e substituído quando necessário. A colônia foi revigorada por meio da adição de novos adultos coletados no campo, e ninfas obtidas no laboratório foram criadas até atingirem o estágio adulto, reiniciando o ciclo. Sementes de soja cv. BRS Tordilha RR foram semeadas

semanalmente em pequenos copos plásticos (100 ml) e em vasos maiores (5L) e mantidos em casa de vegetação (Figura 1A-C).

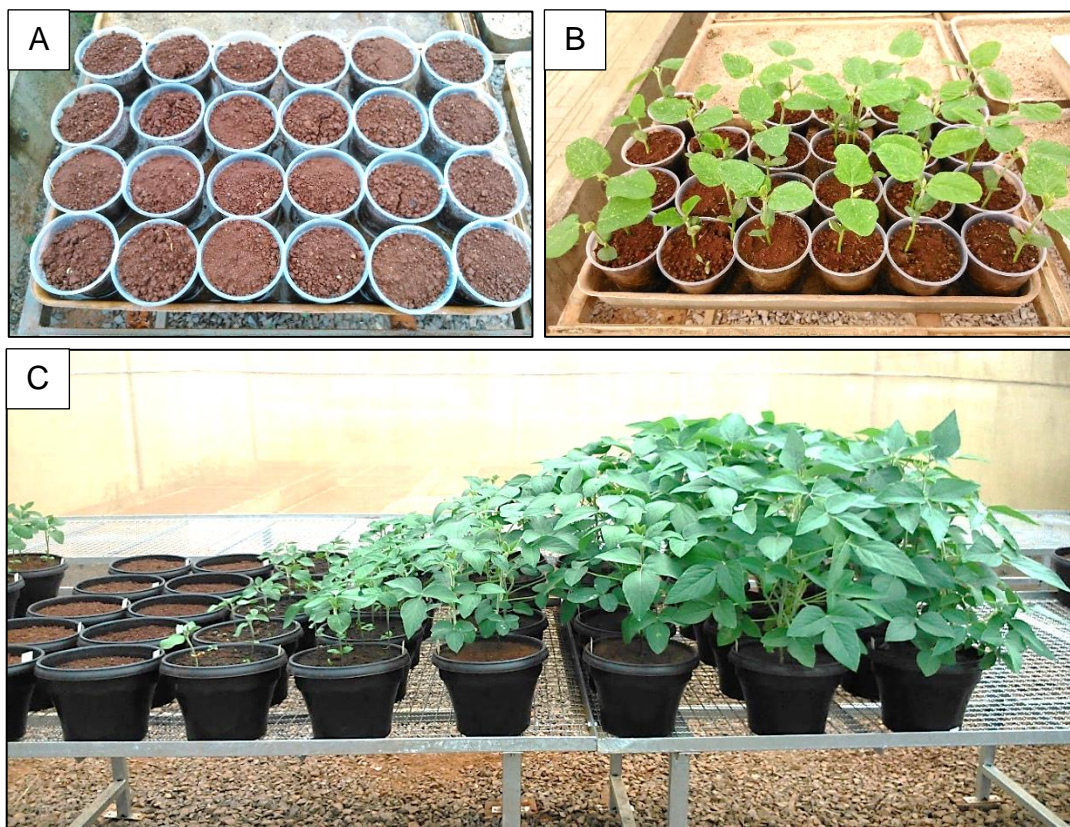


Figura 1 - Plantas de soja semeadas em copos plásticos descartáveis (100 ml) (A, B) e em vasos plásticos (5L) (C) mantidos em casa de vegetação.

O comportamento alimentar do percevejo foi avaliado em diferentes estruturas da planta de soja, sendo essas o folíolo, haste e vagem (Figuras 2A-C). Para isso, as plantas crescidas nos copos menores, estágio V2 (primeira folha trifoliada completamente desenvolvida de acordo com a escala de FEHR et al., 1971), foram usadas para estudos com EPG nas estruturas vegetativas (folíolo e haste). Enquanto que as plantas crescidas nos vasos maiores foram usadas nos estudos com estruturas reprodutivas, ou seja, vagens no estágio R5 (enchimento de grão de acordo com a escala de FEHR et al., 1971). Nesse último, hastes contendo vagens foram excisadas (plantas inteiras carregando vagens eram grandes demais para colocar dentro da gaiola de Faraday) com um estilete e então colocadas dentro de pequenos frascos de vidro preenchidos com areia úmida como substrato. O eletrodo da planta foi introduzido na areia úmida.

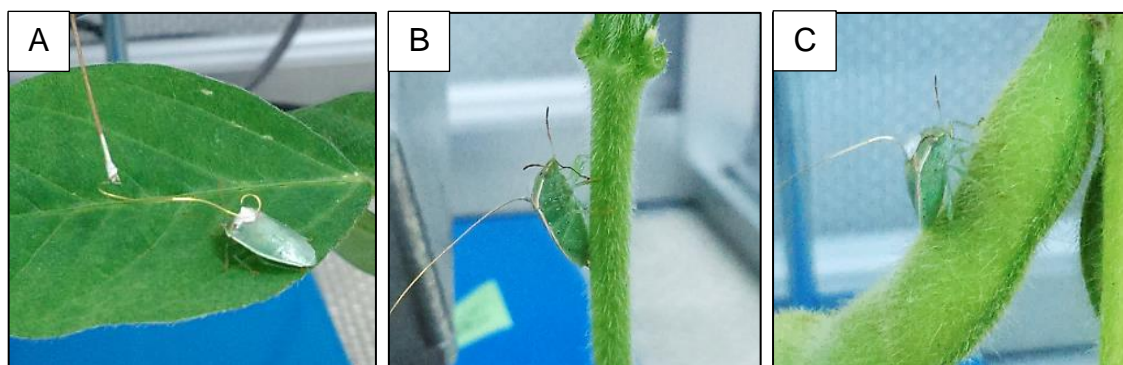


Figura 2 - Fêmeas adultas de *Piezodorus guildinii* presas ao fio de ouro durante a gravação de seu comportamento alimentar em estruturas vegetativas de soja: folíolo (A) e haste (B) e em estrutura reprodutiva: vagem de soja (C).

4.2.2 Gravação do gráfico de penetração elétrica (EPG)

Nesse estudo nós usamos um novo tipo de monitor EPG composto por quatro canais ajustáveis AC-DC (BACKUS; BENNETT, 2009; EPG Technologies, Inc., Gainesville, FL, USA), para gravar durante 8 horas (9:00 - 17:00). Durante todo o experimento, a configuração do equipamento foi padronizada para gravar com corrente alternada (AC) aplicando 50 mV, impedância de entrada de 10^7 Ohms, e amplificação (ganho) de 450x (ganho de 4500, pois há um ganho fixo de 100x no amplificador). Para manter a fidelidade da forma de onda nativa, os sinais de saída de pre-retificação e de pós-retificação foram gravados simultaneamente em canais separados, então o botão de deslocamento (*Offset*) foi usado para fazer coincidir visualmente os dois sinais.

Mudanças na voltagem de saída durante as atividades dos estiletes foram amplificados, capturados e amplificados a uma taxa de 100 amostras por segundo por canal usando o equipamento WinDaq DI-710 (Dataq® Instruments, Akron, OH, USA) e gravado usando um laptop HP Pentium com o software WinDaq Lite (Dataq) instalado. As gravações foram feitas com os amplificadores (quatro canais), plantas e insetos mantidos dentro de uma gaiola de Faraday para reduzir as interrupções elétricas externas, em uma sala fechada mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com luz artificial.

Para analisar o comportamento alimentar de *P. guildinii*, fêmeas com idade similar (10-14 dias) foram separadas da colônia de laboratório e mantidas em jejum durante 18 horas antes da gravação. Após esse período, as fêmeas adultas foram imobilizadas usando uma fita adesiva presa na porção posterior do abdômen no topo de uma tampa de placa de Petri, e

tiveram seus pronotos lixados de acordo com a metodologia desenvolvida por Lucini e Panizzi (2016), para melhorar o sucesso da fixação do fio de ouro.

Um filamento de ouro fino e flexível (± 3 cm de comprimento e 0,1 mm de diâmetro) (Sigmund Cohn Corporation, Mount Vernon, NY, USA), foi colado a um eletrodo de cobre, o qual tinha sido previamente soldado a um pequeno prego de cobre. Na extremidade do fio de ouro, um pequeno “*looping*” (0,5 mm) foi feito para expandir a superfície de contato do fio com o pronoto do percevejo e para melhorar a condutividade elétrica. Uma gota de cola de prata condutiva (água destilada: flocos de prata [Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA]: cola branca [Elmer's Glue.All, Westerville, OH, USA] (1:1:1;V:P:V), foi colocada no centro da área lixada do pronoto, e a ponta do fio mantendo o *looping* foi mergulhada na cola e mantida durante 40 minutos para secar.

Após esse período, a fita adesiva foi cuidadosamente removida e o percevejo permaneceu pendurado no ar por ± 10 minutos, antes de iniciar o monitoramento das atividades alimentares, para ter certeza que o fio estava fixado ao corpo do percevejo. O prego contendo o fio de cobre + fio de ouro com o percevejo preso, foi conectado no amplificador do EPG e o eletrodo da planta foi inserido no substrato contendo a plântula de soja ou o fragmento de haste carregando as vagens. Assim, o circuito elétrico foi fechado no momento em que o inseto inseriu seus estiletes, permitindo a gravação. Ao todo, foram gravadas 64 fêmeas adultas, sendo, 22, 25 e 17 percevejos sobre folíolos, hastes e vagens, respectivamente.

As formas de onda foram caracterizadas levando-se em consideração formas de onda previamente obtidas para outras espécies de insetos sugadores, considerando aparência, amplitude, frequência e origem elétrica, ou seja, resistência (R) e força eletromotriz ou biopotencial (emf). As amplitudes mínima e máxima de cada forma de onda foram determinadas em comparação à forma de onda com a maior amplitude durante cada evento, para isso foi considerada a diferença entre o menor vale e o maior pico (fornecendo a amplitude relativa), de acordo com Backus et al. (2013). Amplitude e frequência da forma de onda foram estimadas baseando-se na média de cinco observações para cada inseto, com um número variável de observações para cada forma de onda.

O componente primário ou origem elétrica das formas de onda, ou seja, R e/ou emf, pode ser determinado pela mudança da impedância de entrada (R_i) entre os seus diferentes níveis durante a gravação de uma determinada forma de onda. De acordo com Backus e Bennett (2009), em baixos níveis de R_i (10^6 a 10^7 Ohms), o componente R é mais enfatizado, tornando-se primariamente R em 10^6 Ohms (para modelos com afídeos). Em contraste, o

componente emf é mais enfatizado em maiores níveis de Ri (10^9 a 10^{13} Ohms), tornando-se completamente emf em 10^{13} Ohms (novamente, para modelos com afídeos).

Portanto, pode-se identificar qual é o principal componente, R, emf ou uma mistura de ambos a partir de mudanças na amplitude e aparência da forma de onda. Todos os percevejos gravados iniciaram com Ri de 10^7 Ohms e mudanças foram feitas de 10^6 a 10^{13} Ohms durante a ocorrência de uma forma de onda específica. Para 10^{13} Ohms, a voltagem aplicada foi alterada para 0 mV antes da gravação.

4.2.3 Análises histológicas dos tecidos vegetais

Nós realizamos correlações via análises histológicas entre a posição dos estiletes e/ou da bainha salivar em hastes e vagens de soja e as diferentes formas de onda observadas durante as gravações com EPG AC-DC. Para esse estudo, um segundo conjunto de fêmeas adultas de *P. guildinii* foi gravado usando as mesmas condições das gravações prévias com o EPG. Quando a respectiva forma de onda de interesse foi observada, o monitor EPG foi desligado e os estiletes foram cuidadosamente seccionados usando uma micro tesoura entomológica. Em seguida, os tecidos da haste e da vagem foram seccionados a mão, corados em azul de toluidina a 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e embebidos em gelatina glicerizada para montar as lâminas semi-permanentes, de acordo com a metodologia proposta por Lucini e Panizzi (2016).

A posição da ponta dos estiletes e/ou da bainha salivar em haste e vagem de soja foi determinada baseada em quatro espécimes para cada forma de onda Pg1b e Pg1c, seis espécimes para Pg2 e três espécimes para Pg3. Imagens digitais foram capturadas, usando um microscópio Olympus BX50 (Shinjuku, Tokyo, Japan) acoplado a uma câmera de vídeo Sony DXC 107A (Minato, Tokyo, Japan) ligado a um computador.

4.3 Resultados

4.3.1 Caracterização das formas de onda

Durante as gravações em estruturas vegetativas (folíolo e haste) e reprodutivas (vagem) de plantas de soja, fêmeas adultas de *P. guildinii* produziram onze tipos diferentes de formas de onda. No caso das formas de onda relacionadas a atividades alimentares, os tipos foram denotados por Pg (de *P. guildinii*) seguida por um número e um subtipo, quando

presente, adicionando uma letra minúscula. As formas de onda foram nomeadas: Np, Z, R, Pg1a, Pg1b, Pg1c, Pg1d, Pg2, Pg3a, Pg3b e Pg4, agrupadas em três famílias diferentes nomeadas: P, I e N. Essas formas de onda estão sumarizadas na Tabela 1 e nas Figuras 3-9.

As onze formas de onda foram descritas baseadas em suas características elétricas (ou seja, frequência [Hz], amplitude relativa [mínima e máxima], e origem elétrica [Resistência – R ou força eletromotriz – emf]). Devido às formas de onda originadas nas três estruturas avaliadas apresentarem características similares, nós agrupamos elas em uma mesma tabela.

Como em outros estudos, as formas de onda foram divididas em: ondas relacionadas às atividades de não alimentação (Np, Z e R) e formas de onda relacionadas com atividades alimentares (Pg1, Pg2, Pg3 e Pg4). Essa última foi composta de três principais fases: 1) inserção e penetração dos estiletes, 2) fase de ingestão e 3) interrupção. A fase de inserção e penetração apresentou apenas uma família (P) que foi dividida em quatro diferentes subtipos de formas de onda (Pg1a, Pg1b, Pg1c e Pg1d). A fase de ingestão foi formada por uma família (I) que abrange as formas de onda Pg2, Pg3a e Pg3b, e a fase de interrupção também formada por uma família (N) que engloba apenas uma forma de onda (Pg4).

Formas de onda relacionadas às atividades de não alimentação (Np, Z e R). Durante a forma de onda Z (n = 64), o percevejo manteve-se parado na superfície da planta. Esse comportamento ocorreu durante períodos de baixa amplitude relativa, o que representou a linha base da gravação. Esses eventos Z foram intercalados com uma forma de onda com alta amplitude relativa e frequência irregular com muitos picos, chamada onda Np (n = 64), a qual foi correlacionada com movimentos do percevejo sobre a superfície da planta (Figura 3A, Tabela 1).

Tabela 1 - Sumário das formas de onda EPG AC-DC, suas características elétricas, e atividades biológicas propostas para cada forma de onda de *Piezodorus guildinii* gravadas em plantas de soja durante o período vegetativo (folíolo e haste – estágio V2) e período reprodutivo (vagem – estágio R5).

Fase	Família	Tipo ou subtipo	Estrutura da planta	Amplitude relativa (%)	Frequência (Hz)	Origem elétrica	Atividades biológicas propostas ^a
Não alimentação	-	Np	Folíolo/haste/vagem	Baixo/alto	Irregular	-	Caminhando sobre a superfície da planta
	-	Z	Folíolo/haste/vagem	Muito baixo	Irregular	-	Parado sobre a superfície da planta
	-	R	Folíolo/haste/vagem	Alto	Irregular	-	Tocando a superfície da planta com o rostro (lábio)
Inserção e penetração dos estiletes	P	Pg1a	Folíolo/haste/vagem	93 (45-100)	Irregular	R	Início da inserção dos estiletes e secreção de saliva geleificante espessa para formar o tronco da bainha salivar
	P	Pg1b	Folíolo/haste/vagem	78 (31-100)	Irregular + expurgos de picos regulares 3,6 Hz (2,3-4,7)	R	Penetração dos estiletes e secreção de saliva geleificante para formar ramificações da bainha salivar
	P	Pg1c	Folíolo/haste/vagem	40 (15-89)	Irregular	R	Liberação de saliva geleificante mais fina e penetração mais profunda dos estiletes

Continua ...

Fase	Família	Tipo ou subtipo	Estrutura da planta	Amplitude relativa (%)	Frequência (Hz)	Origem elétrica	Atividades biológicas propostas^a
Inserção e penetração dos estiletes	P	Pg1d	Haste/ vagem	25 (12-46)	4,9 Hz (4,2-6,0)	-	Percevejo encontrou uma camada de célula rígida requerendo a protração e retração dos estiletes
Ingestão	I	Pg2	Folíolo/haste/ vagem	30 (13-61)	3,6 Hz (2,8-4,8)	Mistura; pico = R, onda = emf	Ingestão de seiva do xilema
Salivação	I	Pg3a	Vagem	29 (15-48)	Irregular	R/emf	Salivação aquosa no endosperma da semente
Ingestão	I	Pg3b	Vagem	8 (5-12)	4,4 (4,3-4,6)	emf	Ingestão do conteúdo do endosperma da semente
Interrupção	N	Pg4	Folíolo/haste/ vagem	36 (14-66)	Irregular	R	Breves intervalos de salivação durante a ingestão no xilema

^aBaseado em estudos prévios realizados com outros insetos picadores sugadores (ver referências no texto).

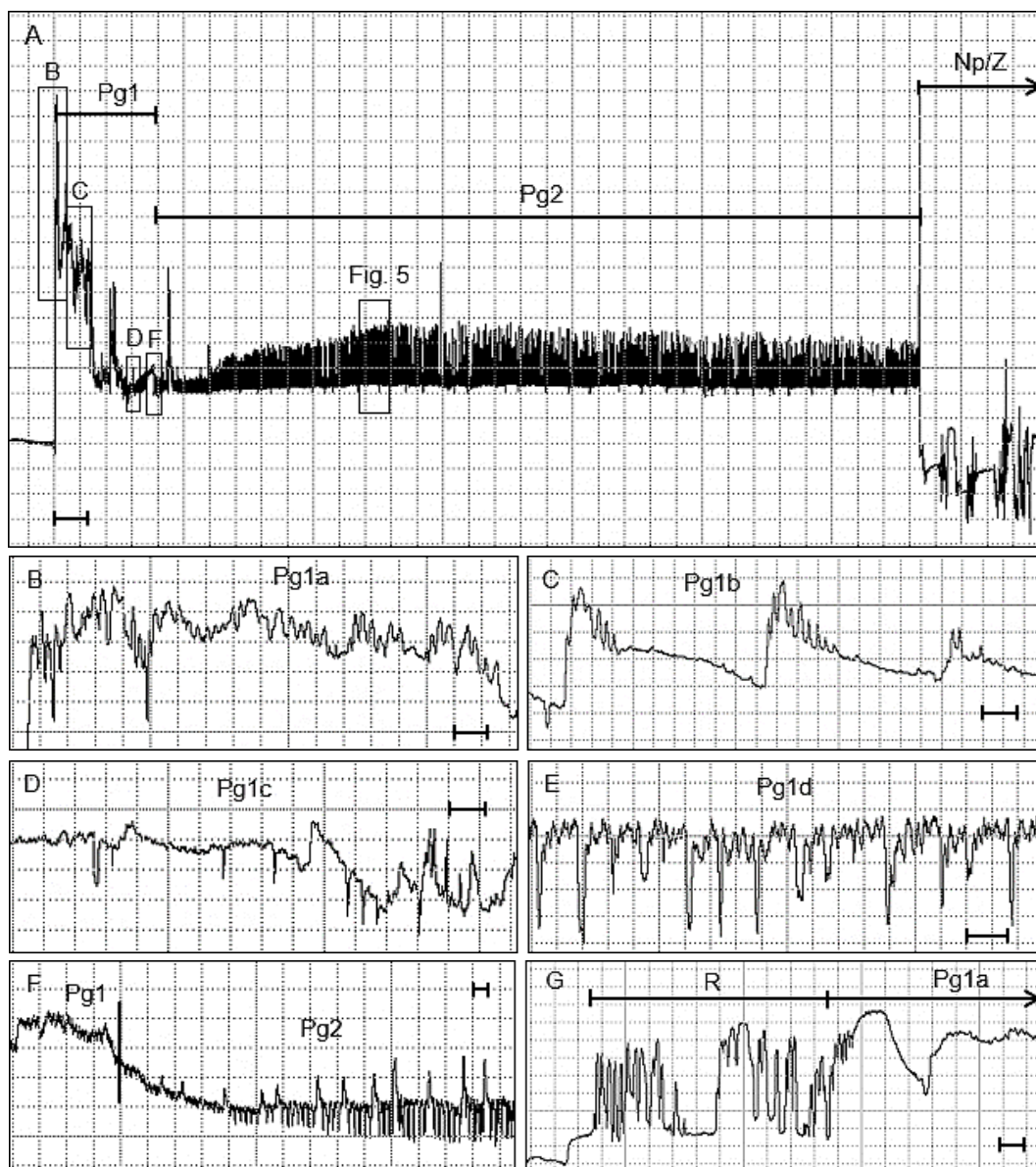


Figura 3 - Formas de onda geradas usando EPG AC-DC (impedância de entrada de 10^7 Ohms) gravadas durante as atividades alimentares de fêmeas adultas de *Piezodorus guildinii* em folíolo, haste e vagem de soja. Visão geral do comportamento alimentar em folíolo de soja (~53 min) (A). Detalhes das formas de onda Pg1a, Pg1b, Pg1c e Pg1d (B, C, D, E, respectivamente). Transição entre as formas de onda Pg1 e Pg2 (F). Detalhe da forma de onda R mostrando o momento em que o percevejo toca a superfície da planta antes de iniciar a inserção dos estiletes (forma de onda Pg1a) (G). Figura A tem Windaq compressão 400 [80 s/divisão vertical], ganho de 16x. B tem compressão 4 [0,8 s/divisão vertical], ganho de 8x. C tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 16x. D tem compressão 4 [0,8 s/divisão vertical], ganho de 64x. E tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 64x. F tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 32x. G tem compressão 5 [1 s/divisão vertical], ganho de 16x. Figura A = barra de escala equivale a 100s, figuras B-G = barra de escala equivale a 1s.

A forma de onda R ($n = 46$) foi observada quando o percevejo tocou a superfície da planta com seu rostro (lábio) antes de iniciar a penetração dos estiletes nos tecidos vegetais (forma de onda Pg1, ver abaixo). R apresentou picos com elevada amplitude que podem ser distinguidos de Np por serem mais largos e mais regulares e de Pg1 por serem mais largos e o nível de voltagem sempre retorna para o nível da linha base antes de iniciar Pg1 (Figura 3G, Tabela 1). Entretanto, essa forma de onda não foi claramente observada em todas as gravações, pois usualmente o percevejo tocou a superfície da planta brevemente e apenas uma vez antes de iniciar a inserção dos estiletes.

Fase de inserção e penetração dos estiletes. Família P (Pg1a, Pg1b, Pg1c e Pg1d).

Correlações histológicas demonstraram que a bainha salivar foi secretada durante pelo menos no início de cada atividade alimentar em todos os tecidos vegetais avaliados. Entretanto, as bainhas salivares foram facilmente observadas no microscópio, mas nas imagens digitais, as bainhas não são tão evidentes em algumas secções, pois os cortes histológicos foram espessos (secções feitas à mão).

Essa fase representa a penetração profunda dos estiletes internamente nos tecidos da planta, em folíolo, haste e vagem. A família P consistiu de um único tipo de forma de onda, Pg1, a qual foi dividida em quatro subtipos diferentes, chamados Pg1a, Pg1b, Pg1c e Pg1d (Figuras 3B-E; 4B-F). Essas formas de onda foram observadas em todos os três tecidos vegetais, exceto a forma de onda Pg1d, a qual foi observada apenas ocasionalmente em haste e mais frequentemente em vagens de soja, mas nunca em folíolo. Além disso, a fase de inserção e penetração dos estiletes mostrou alto nível de voltagem no início, após a inserção, a qual decresceu gradualmente ao longo do tempo (Figuras 3A, 4B).

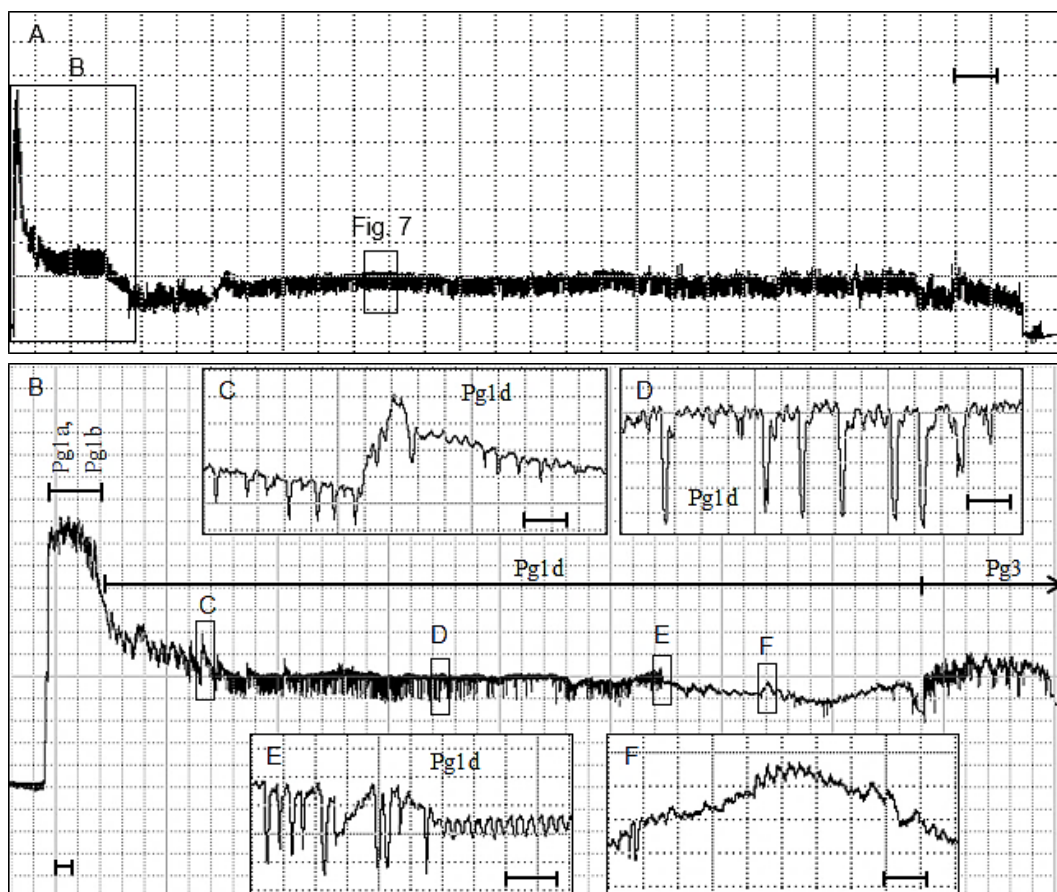


Figura 4 - Formas de onda geradas usando EPG AC-DC (impedância de entrada de 10^7 Ohms) gravadas durante as atividades alimentares de *Piezodorus guildinii* em vagem de soja (endosperma da semente). Visão geral do comportamento alimentar de uma sessão alimentar (~80 min) (A). Visão expandida mostrando a sequência de eventos, formas de onda Pg1a → Pg1b → Pg1d → Pg3, e detalhes da forma de onda Pg1d (B). Detalhe do pico observado durante os estádios iniciais da forma de onda Pg1d (C). Estádio médio da forma de onda Pg1d (D). Padrão de transição antes do início da forma de onda Pg3 (E, F). Figura A tem Windaq compressão 800 [160 s/divisão vertical], ganho de 4x. B tem Windaq compressão 70 [14 s/divisão vertical], ganho de 16x. C tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 32x. D tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 64x. E tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 64x. F tem compressão 4 [0,8 s/divisão vertical], ganho de 64x. Figura A = barra de escala equivale a 200s, figura B = barra de escala equivale a 10s, figuras C-F = barra de escala equivale a 1s.

Forma de onda Pg1a. Essa forma de onda ($n = 64$) ocorreu imediatamente após a inserção dos estiletes nos tecidos vegetais em cada evento alimentar. O nível de voltagem aumentou repentinamente a partir da linha base (forma de onda Z) como uma linha vertical (Figuras 3A, B; 4B). Portanto, essa forma de onda representa o primeiro contato elétrico entre os estiletes e os tecidos da planta, e assim o primeiro associado com eventos de alimentação.

Pg1a foi muito breve (duração de poucos segundos) com origem elétrica dominada pelo componente R (resistência) e alta amplitude relativa com picos irregulares. Além disso, Pg1a teve, na maioria das vezes, a maior amplitude relativa entre todas as formas de onda registradas em cada evento (Tabela 1).

Forma de onda Pg1b. Sempre foi gravada após a forma de onda Pg1a. Pg1b (n = 60) foi uma onda com um padrão estereotípico de repetição de episódios. Cada episódio foi caracterizado pelo rápido aumento do nível de voltagem seguido por uma diminuição gradual (Figura 3C). Frequentemente, Pg1b iniciou com picos largos de alta amplitude composta de breves expurgos de picos (frequência de 2,3 a 4,7 Hz) no topo do seu platô. Pg1b teve uma origem elétrica dominada por R (Tabela 1).

Forma de onda Pg1c. Essa onda (n = 42) seguiu a forma de onda Pg1b, mas não foi visível em todas as gravações nas três estruturas da planta de soja. Pg1c foi caracterizado por uma breve queda de potencial a partir de Pg1b, a qual marcou seu início. Pg1c foi primariamente uma forma de onda plana com média a alta amplitude relativa, frequência irregular e origem elétrica dominada por R (Figura 3D, Tabela 1).

Forma de onda Pg1d. Frequentemente seguindo a forma de onda Pg1b, Pg1d (n = 16) foi encontrada apenas durante a alimentação dos percevejos em hastes e vagens de soja. Picos no seu início foram comuns, mas esses picos desapareceram uma vez que a forma de onda se tornou estável (Figura 4C). Esse padrão de onda estereotípica ocorreu antes das formas de onda Pg2 em haste e vagem, e Pg3 em vagem. Ela usualmente teve baixa a média amplitude (12-46%), frequência regular variando de 4,2 a 6,0 Hz, com picos voltados para baixo (Figuras 3E, 4C-E, Tabela 1). No final de Pg1d e logo antes de iniciar a forma de onda Pg3, e às vezes Pg2, um curto padrão de transição foi observado, o qual foi caracterizado por uma mistura de frequência regular (4,8 Hz) e platôs com frequência irregular (Figuras 4E, F).

Fase de ingestão. Família I (Pg2, Pg3a e Pg3b). A família I foi composta de três diferentes formas de onda, nomeadas Pg2, Pg3a e Pg3b. A forma de onda Pg2 (n = 62) ocorreu nas seguintes sequências de eventos: Pg1a → Pg1b → Pg2 ou Pg1a → Pg1b → Pg1c → Pg2 (essa última foi mais frequente), enquanto a sequência Pg1a → Pg1b → Pg1d → Pg2 (gravada apenas em haste e vagem) foi raramente observada. No início de Pg2, uma diminuição do nível de voltagem a partir de Pg1b ou Pg1c foi observada (Figura 3F).

Pg2 foi gravada em todas as três estruturas testadas (folíolo, haste e vagem) e, em geral, apresentou características elétricas similares, às vezes com uma leve diferença apenas na aparência da forma de onda (Figuras 5A-F). Pg2 mostrou média amplitude (30%), e frequência regular variando de 2,8 a 4,8 Hz (média de 3,6 Hz) para todas as estruturas

avaliadas (Tabela 1). Além do mais, Pg2 foi sempre composta de ondas repetitivas intercaladas com picos voltados para cima, os quais ocorreram em intervalos regulares ao longo de toda a forma de onda (Figura 5B).

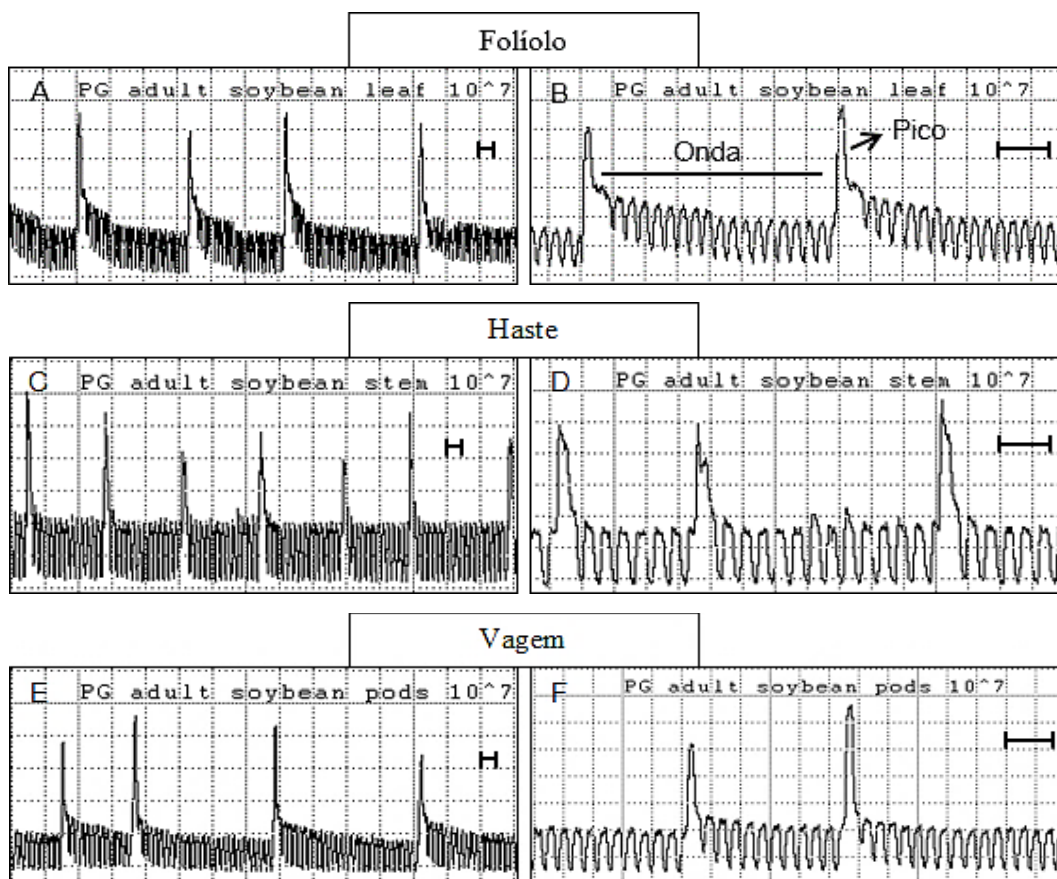


Figura 5 - Detalhe da forma de onda Pg2 gravada durante o comportamento alimentar de *Piezodorus guildinii* em folículo (A, B), haste (C, D) e vagem (E, F) de soja (impedância de entrada de 10^7 Ohms). Definição de onda e pico na figura B. Figura A tem Windaq compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 32x. B tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 32x. C tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 64x. D tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 64x. E tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 32x. F tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 32x. Figuras A-F= barra de escala equivale a 1s.

Em relação à origem elétrica (Figuras 6A-H), o presente estudo demonstrou que a forma de onda Pg2 teve uma mistura dos componentes R e emf (Tabela 1). Em baixos níveis de Ri (10^6 a 10^7 Ohms), picos foram mais enfatizados que as ondas, as quais foram suaves em 10^6 Ohms (Figuras 6A, B). Por outro lado, a porção composta pelas ondas foi mais fortemente enfatizada em Ri de 10^9 Ohms ou superior (Figuras 6G, H), onde os picos quase

desapareceram completamente dentro da porção das ondas. Essas mudanças suportam que os picos são essencialmente dominados pelo componente R, enquanto que a porção da onda foi principalmente dominada pelo componente emf.

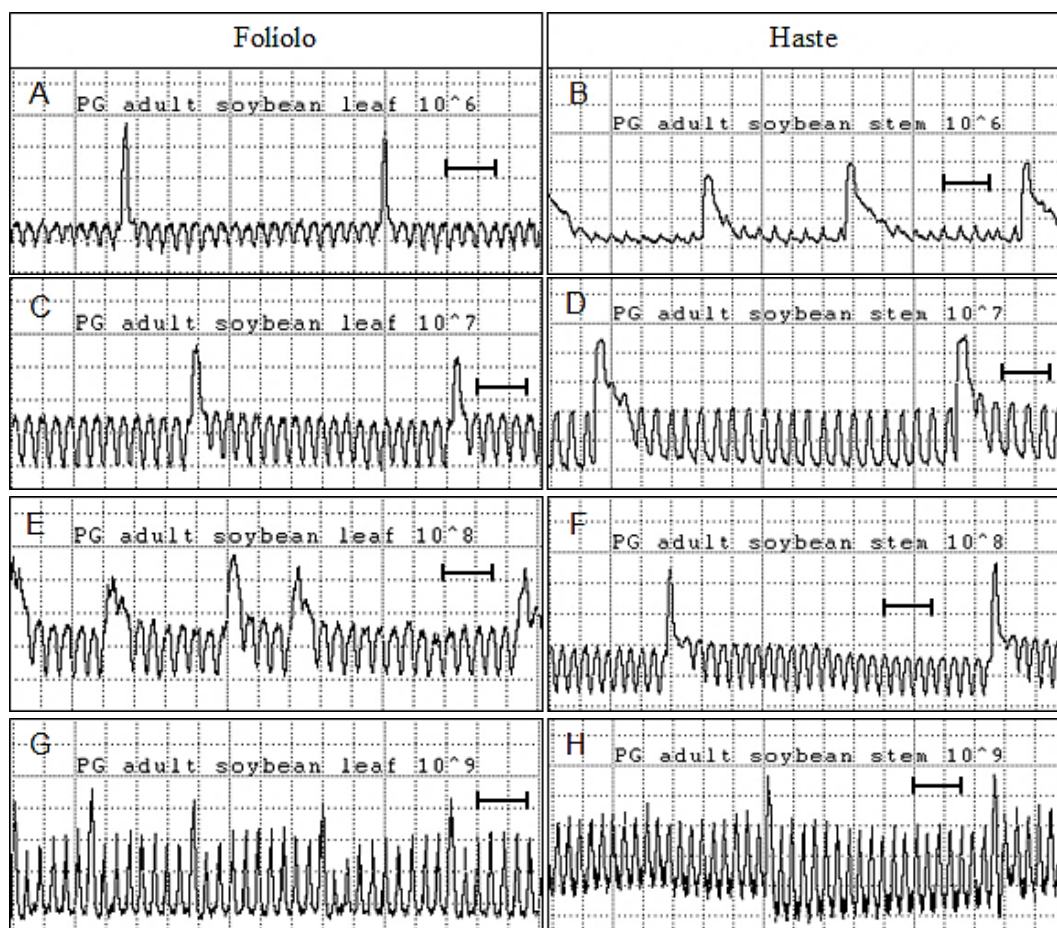


Figura 6 - Comparação da forma de onda Pg2 (estável) gravada durante o comportamento alimentar de adultos de *Piezodorus guildinii* em quatro diferentes níveis de impedâncias (10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 Ohms) aplicado no folíolo (A, C, E, G) e na haste (B, D, F, H) de plantas de soja. Folíolo tem Windaq compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganhos de $10^6 = 128x$, 10^7 - $10^9 = 16x$. Haste tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganhos de 10^6 - $10^7 = 64x$, 10^8 - $10^9 = 32x$. Figuras A-H = barra de escala equivale a 1s.

A forma de onda Pg3 foi observada apenas quando *P. guildinii* se alimentou em vagens de soja e foi dividida em dois diferentes subtipos: Pg3a e Pg3b (Figuras 7A, B). Em geral, Pg3 foi sempre precedida pelo subtipo Pg1d, ocorrendo na seguinte sequência de eventos: Pg1a → Pg1b → Pg1d → Pg3 (Figura 4B), e não foi composta por uma repetição regular como a forma de onda Pg2. Pg3a foi observado apenas em 35% dos percevejos

gravados em vagens ($n = 6$), apresentou baixa a média amplitude, ca. 30% (variando de 15 a 48%), frequência irregular com picos largos e voltados para baixo (Figuras 7A, B, Tabela 1).

A onda Pg3b ($n = 6$) foi usualmente caracterizada por curtas durações, sempre intercalada com a forma de onda Pg3a (Figuras 7A, B). Apresentou também baixa amplitude relativa com aparência de uma linha plana (média de 8%), mas com frequência muito regular, variando de 4,3 a 4,6 Hz (Tabela 1).

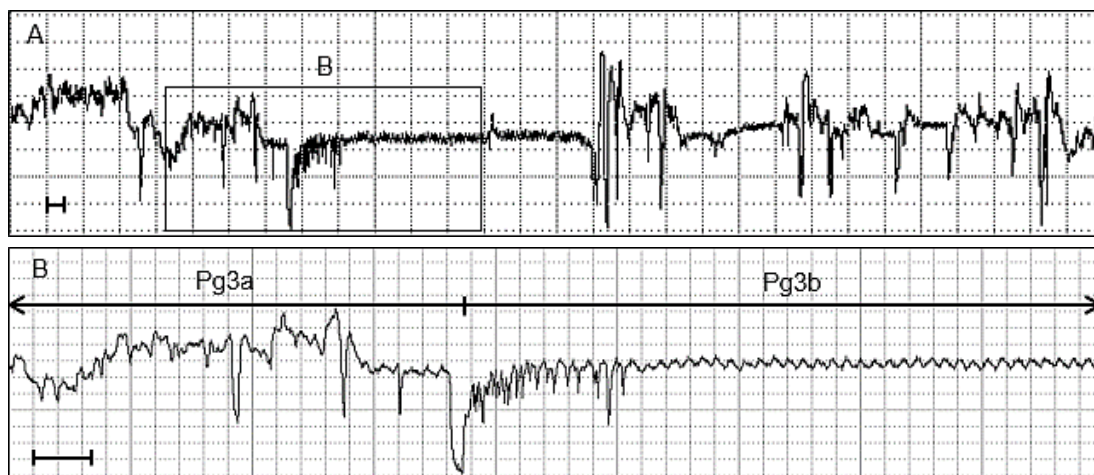


Figura 7 - Detalhe das formas de onda Pg3a (dilaceramento/ maceramento celular) e Pg3b (ingestão) gravadas durante as atividades alimentares de *Piezodorus guildinii* em vagem de soja (endosperma da semente) usando EPG AC-DC (impedância de entrada de 10^7 Ohms) (A, B). Figura A tem Windaq compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 64x. B tem compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho de 128x. Figuras A-B = barra de escala equivale a 1s.

Pg3a demonstrou uma mistura de origens, ou seja, ambos os componentes (R e emf) estiveram presentes, pois em baixos níveis de Ri (10^6 a 10^7 Ohms), Pg3a exibiu picos voltados para baixo, enquanto que em maiores níveis de Ri (10^9 Ohms ou superior) a maioria dos picos inverteram para cima (Figura 8). A forma de onda Pg3b foi suave em 10^6 Ohms comparado com maiores níveis de Ri, e sua aparência foi mais enfatizada em 10^9 Ohms (Figura 8). Esses resultados suportam que Pg3b foi composto principalmente pelo componente emf (Tabela 1).

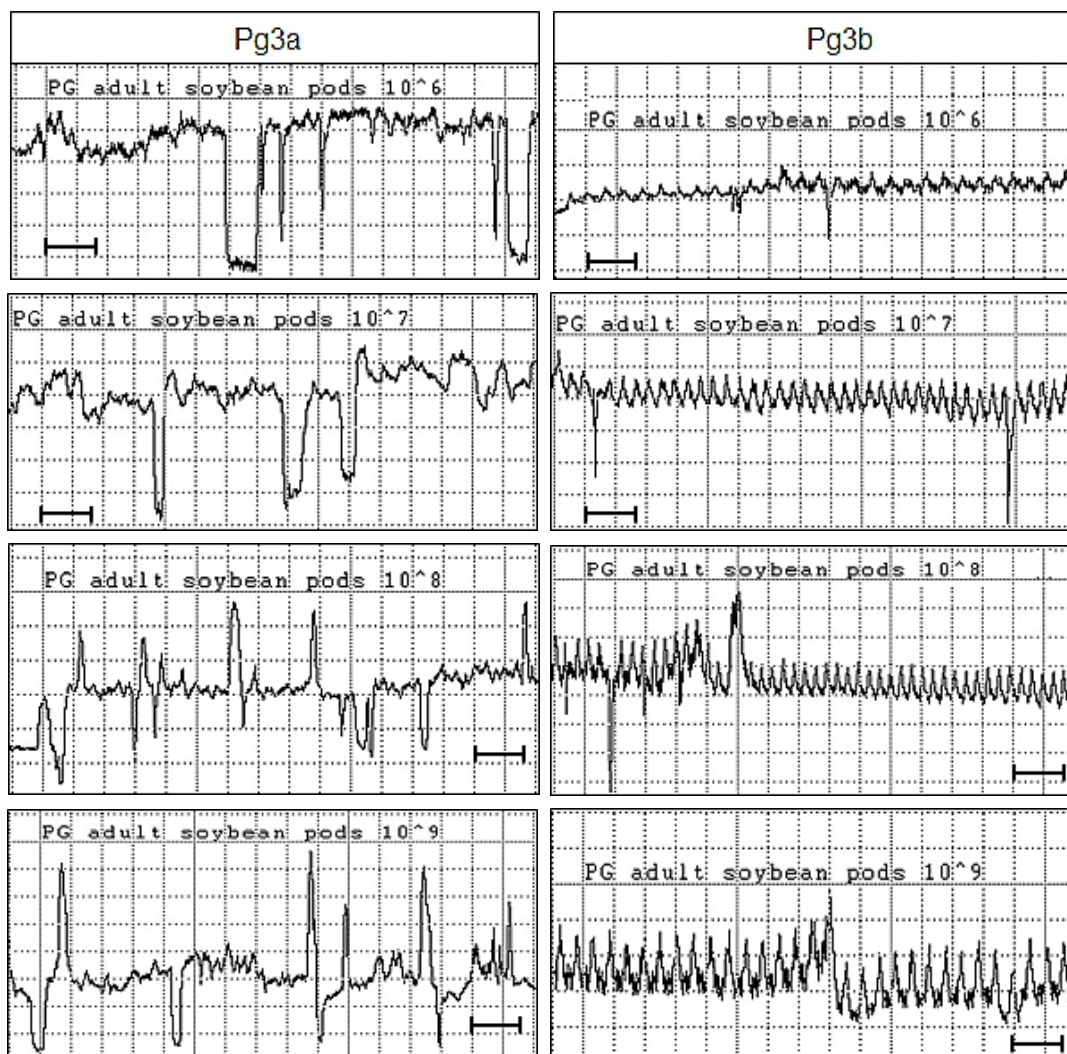


Figura 8 - Comparação das formas de onda Pg3a e Pg3b (estáveis) gravadas durante o comportamento alimentar de adultos de *Piezodorus guildinii* em quatro diferentes níveis de impedância (10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 Ohms) aplicado na vagem de soja. Forma de onda Pg3a tem Windaq compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganhos de $10^6 = 128x$, $10^7 = 64x$, 10^8 - $10^9 = 16x$. Forma de onda Pg3b tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganhos de 10^6 - $10^7 = 128x$, 10^8 - $10^9 = 32x$. Todas as figuras = barra de escala equivale a 1s).

Fase de interrupção. Família N (Pg4). Essa família é composta de breves interrupções (~4s), que ocorreram durante a forma de onda Pg2, e apresentou apenas um tipo de forma de onda, nomeada Pg4. Essa onda ($n = 23$) mostrou formato irregular, média a alta amplitude relativa (14-66%) e platô com picos esparsos. A onda Pg4 ocorreu principalmente no início da forma de onda Pg2, foi observada em 36% dos percevejos gravados e foi repetida em média 3 vezes por inseto nas três estruturas avaliadas (Figuras 9A, B; Tabela 1).

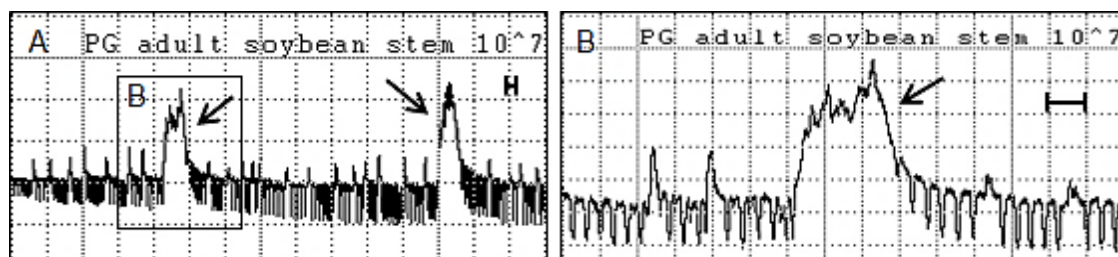


Figura 9 - Detalhe das interrupções (setas) denominada forma de onda Pg4, observadas durante a forma de onda Pg2 (ingestão no xilema) (A, B). Figura A tem Windaq compressão 20 [4 s/divisão vertical], ganho de 16x, B tem compressão 5 [1 s/divisão vertical], ganho de 32x. Figuras A, B = barra de escala equivale a 1s.

4.3.2 Correlações entre as formas de onda e a posição da ponta dos estiletes e/ou bainha salivar nos tecidos vegetais

Durante a penetração dos estiletes de *P. guildinii*, uma bainha salivar sempre circundou os estiletes durante todo o seu percurso em hastes de soja (Figuras 10A-D). Para a forma de onda Pg1b e Pg1c, todas as pontas dos estiletes decepados e das bainhas salivares ($n = 4$) foram observadas no tecido do parênquima em haste e vagem de soja. Essas descobertas suportam que Pg1 representa a inserção e penetração dos estiletes através desse tecido (Figuras 10A, B). A bainha salivar, às vezes, não foi claramente observada nas imagens, como mostrado nas Figuras 10B, E (entretanto, quando visualizado diretamente em microscópio, a bainha é claramente visível na imagem). Em algumas raras ocasiões, parece que nenhuma bainha salivar é secretada pelo percevejo (Figura 10C).

Durante Pg2, todas as secções em haste e vagem ($n = 6$) revelaram que ambas as pontas dos estiletes e das bainhas salivares (quando produzidas) estavam nas células do xilema em haste de soja (Figuras 10C, D), e em vagem (Figura 10E). Para a onda Pg3, nós fomos incapazes de obter secções visíveis para fazer imagens, entretanto, o corte de vagens frescas ($n = 3$) durante essa forma de onda revelou uma região de coloração branca-opaca, a qual seria a área danificada no endosperma da semente causada pela alimentação do percevejo (Figura 10F).

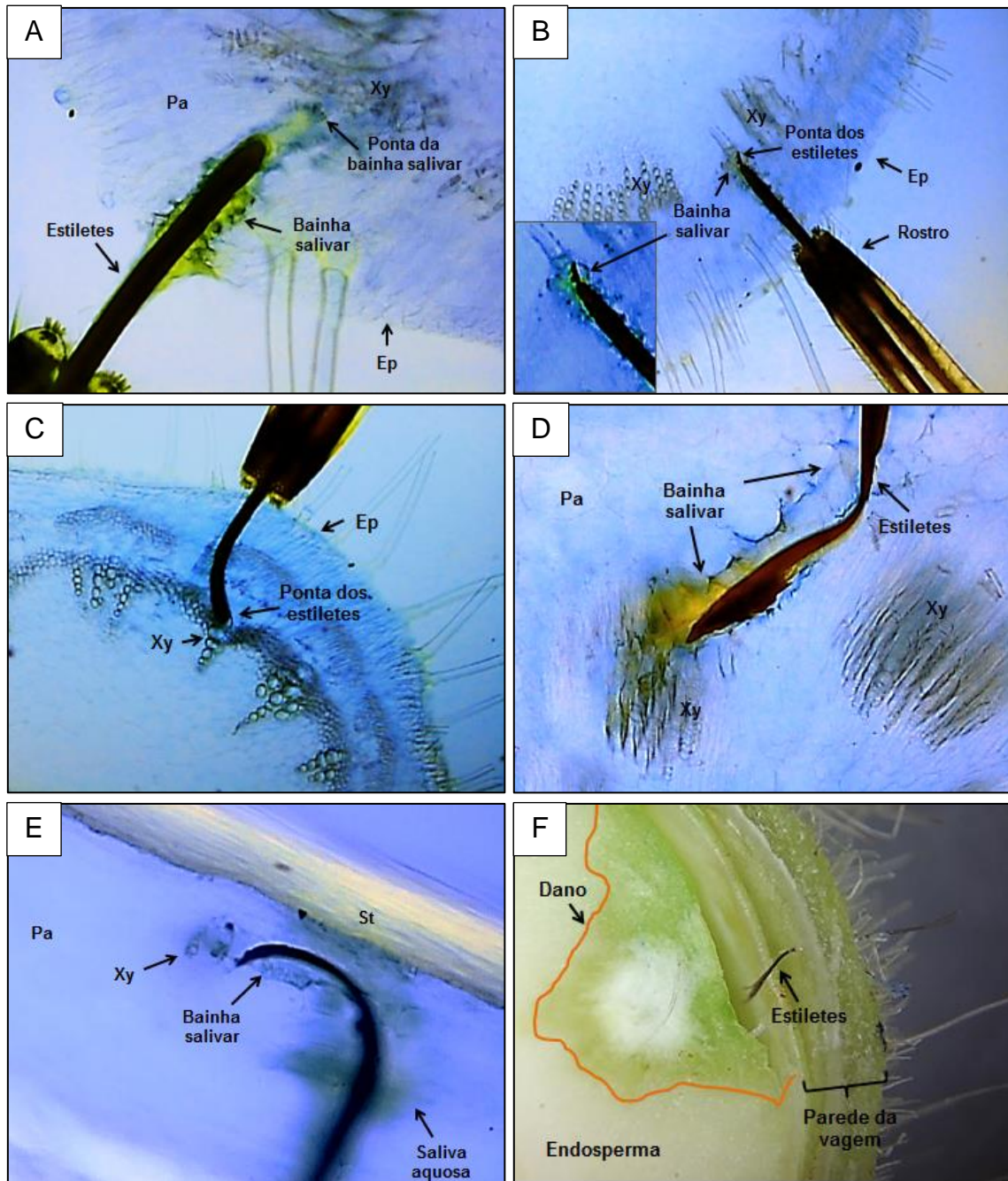


Figura 10 - Secções histológicas de plantas de soja contendo estiletes e bainhas salivares de *Piezodorus guildinii* em haste e vagem de soja. Bainha salivar terminando no tecido do parênquima de haste de soja durante a forma de onda Pg1b (A). Ponta dos estiletes e da bainha salivar no tecido do parênquima de haste de soja, próximo às células do xilema, durante a forma de onda Pg1c (B). Ponta dos estiletes e/ou bainha salivar terminando nos vasos do xilema durante a forma de onda Pg2 gravada em haste de soja (C, D - corte longitudinal em D). Ponta dos estiletes nos vasos do xilema durante a forma de onda Pg2, gravada durante alimentação do percevejo na parede da vagem de soja (E). Secção da vagem de soja mostrando o dano no endosperma da semente próximo ao ponto de inserção dos estiletes, após a gravação da forma de onda Pg3 (F). Linha laranja na figura “F” delimita a área danificada. Ep = epiderme da haste/vagem, Pa = parênquima, St = esclerênquima, Xy = xilema.

4.4 Discussão

Nesse trabalho foi estudado, via EPG, o comportamento alimentar do percevejo *P. guildinii*, uma importante praga da cultura da soja na América do Sul e nos Estados Unidos. Nós descrevemos onze formas de onda, usando o monitor EPG AC-DC, associadas com o comportamento alimentar de *P. guildinii* em três estruturas distintas da planta de soja. Além disso, nós produzimos a primeira biblioteca de formas de onda (coleção de formas de onda em múltiplas impedâncias [Ri] de entrada) para percevejo pentatomídeo.

De acordo com a literatura, hemípteros podem usar uma das seguintes estratégias de alimentação: via bainha salivar ou via ruptura de células (BACKUS et al., 2005b, previamente conhecido com alimentação por dilaceramento e descarga [MILES, 1972]). Usando a primeira estratégia, o inseto cria uma bainha salivar pela secreção de saliva solidificante (geleificante), a qual circunda os estiletes durante todo o percurso em direção ao seu sítio principal de alimentação. As formas de onda gravadas durante a formação da bainha salivar são nomeadas de “fase de inserção e penetração dos estiletes”.

Por outro lado, na segunda estratégia, via ruptura de células, o inseto não produz uma bainha salivar completa. Ao invés disso, saliva aquosa (contendo enzimas) é secretada simultaneamente com movimentos contínuos dos estiletes em profundidade nos tecidos vegetais. Essas atividades, causam a dilaceração de células e a maceração enzimática dos tecidos, nesse caso, o inseto ingere o “caldo” do conteúdo celular originado por essas atividades (MILES, 1972).

Acreditamos que *P. guildinii* pode usar ambas as estratégias alimentares. Quando se alimenta em folíolo, haste e vagem (casca da vagem) de plantas de soja o percevejo usa a estratégia da bainha salivar, eno endosperma das sementes ele emprega a estratégia de ruptura celular. A fase de inserção dos estiletes (forma de onda Pg1), caracterizada aqui, parece ocorrer durante ambas às estratégias de alimentação, bainha salivar e ruptura de células.

Fase de inserção e penetração dos estiletes (Pg1a, Pg1b, Pg1c e Pg1d). Pg1a ocorreu durante breves períodos (poucos segundos), e sem dúvida representa a penetração inicial dos estiletes no tecido vegetal. Essa forma de onda sempre ocorreu após a fase de não alimentação (ondas Z, Np e R) e foi gravada em todos os percevejos avaliados. Na sequência, as próximas formas de onda foram usualmente Pg1b e Pg1c. Essas três formas de onda foram gravadas em todas as três estruturas vegetais avaliadas e provavelmente representam a secreção de saliva

geleificante, formação da bainha salivar e penetração dos estiletes em profundidade nos tecidos em direção ao sítio preferido de ingestão.

Essa interpretação foi confirmada em todas as secções histológicas correlacionadas com Pg1b e Pg1c, como reportado para outros formadores de bainha salivar (por exemplo, BONANI et al., 2010; MIRANDA et al., 2009; SEO et al., 2009; LUCINI; PANIZZI, 2016). Essas hipóteses são suportadas pela origem elétrica, a qual foi fortemente dominada pelo componente R nos três subtipos de formas de onda, uma vez que a saliva apresenta elevada condutividade elétrica. Além disso, Pg1b relembra partes da forma de onda G2 dos percevejos *Blissus insularis* Barber e *Blissus occiduus* Barber (BACKUS et al., 2013), a qual foi composta de alta amplitude com platôs (com picos no topo) e vales. A onda G2 foi correlacionada com a secreção de saliva geleificante e formação da bainha salivar.

Às vezes, a bainha salivar não foi claramente observada, ou pode não ter sido formada pelo percevejo. A formação da bainha parece variar de acordo com o tipo de tecido vegetal. Sobre haste e vagem, cinco das seis amostras avaliadas mostraram uma bainha salivar evidente. Entretanto, em vagem de soja, a bainha salivar pode não ter sido formada durante o movimento dos estiletes (embora a imagem esteja fora de foco e definitivamente não mostra a ausência da bainha salivar) (Figura 10E).

No entanto, há a hipótese que *P. guildinii* secreta apenas saliva aquosa quando se alimenta em vagem. Nas imagens histológicas foi possível observar uma fina camada, a qual pode ser a bainha salivar circundando os estiletes no início de sua inserção, e novamente mais tarde, perto dos tecidos do xilema. No entanto, essa hipótese pode ser suportada apenas quando finas secções do tecido da vagem forem obtidas.

A forma de onda Pg1c é similar à forma de onda H de percevejos blissídeos (BACKUS et al., 2013) e com a onda B1 da cigarrinha *Homalodisca coagulata* (Say) (BACKUS et al., 2005a), as quais tem sido correlacionadas com protação (estendimento para dentro) e retração (retirada para fora) dos estiletes para a penetração mais profunda nas células dos tecidos vegetais. Tais atividades foram previamente correlacionadas com a forma de onda B1 via estudos histológicos. Todas as formas de onda previamente citadas (B1, G2 e H) ocorrem com a formação da bainha salivar e são fortemente dominadas pelo componente R, assim com Pg1b e Pg1c de *P. guildinii*.

A forma de onda Pg1d foi gravada apenas quando *P. guildinii* alimentou-se em haste ou mais frequentemente em vagem de soja. Pg1d ocorreu antes da forma de onda Pg2 em haste e vagem, e Pg3 em vagem. Em vagem, foi observada a ocorrência dessa forma de onda quando o percevejo se alimentou em qualquer parte da mesma, ou seja, lóculo da semente,

linha de divisão das sementes ou pedicelo. Nesse último, foram observadas ocorrer três vezes, contudo, o percevejo não atingiu o sítio de ingestão.

Essa forma de onda (Pg1d) poderia ser uma onda X (padrão estereotípico de transição correlacionado com a penetração dos estiletes e subseqüente atividades dentro do tecido preferido de ingestão. Esse tipo de onda, ocorre em 100% das vezes antes dos estiletes do inseto formador da bainha salivar penetrar definitivamente o local preferido, similar as ondas gravadas para outros formadores de bainha salivar (BACKUS et al., 2013; LUCINI; PANIZZU, 2016). Entretanto, acreditamos que Pg1d não seja uma onda X, pois ela foi observada em poucas gravações antes de Pg2 em haste e vagem, e não foi observada em folíolos. Além disso, Pg1d foi também gravada em vagens antes da forma de onda Pg3.

Quando Pg1d ocorreu em vagem de soja, ela foi usualmente correlacionada com o *P. guildinii* empurrando sua cabeça e forçando seus estiletes para dentro dos tecidos da planta, e subseqüentemente retraindo a cabeça e estiletes. Portanto, parece plausível que Pg1d represente dilaceração ou movimentos dos estiletes para serrar. Talvez, Pg1d pode estar relacionado ao fato do percevejo ter encontrado uma camada de células mais rígida (lignificada) que faria a penetração dos estiletes mais difícil. Tal camada de células (esclerênquima) foi observada nas análises histológicas de vagens de soja, a qual o percevejo precisa ultrapassar para atingir o endosperma da semente. Para nosso conhecimento, essa é a primeira vez que esse tipo de forma de onda com picos regulares e para baixo foi gravado durante estudos das atividades alimentares usando EPG.

Fase de ingestão. Ingestão de seiva dos vasos do xilema (Pg2). A forma de onda Pg2 foi gravada em *P. guildinii* que se alimentou em folíolo, haste e vagem. Pg2 está provavelmente associada com atividades dos estiletes nos vasos do xilema, mais especificamente, ingestão de seiva. Pg2 lembra a forma de onda H-I2 gravada nos percevejos *B. insularis* e *B. occiduus* (BACKUS et al., 2013) e com a forma de onda Em2 do pentatomídeo *E. meditabunda* (LUCINI; PANIZZU, 2016), as quais são caracterizadas por ondas regulares intercaladas com picos de grande amplitude.

Além do mais, Pg2 compartilha algumas características elétricas com essas ondas previamente publicadas, tais como: 1) elevada amplitude relativa, 2) mistura de origens elétricas, com picos sendo dominados pelo componente R e ondas por emf, e 3) não estão sendo precedidas por uma onda X. H-I2 e Em2 têm sido correlacionadas com ingestão de seiva do xilema (BACKUS et al., 2013; LUCINI; PANIZZU, 2016). Adicionalmente, Em2 foi correlacionada com a bainha salivar terminando nos vasos do xilema via estudos histológicos

(LUCINI; PANIZZI, 2016). Da mesma maneira, nossos estudos histológicos com *P. guildinii* demonstraram que ambas, as pontas dos estiletes e das bainhas salivares, terminaram nos vasos do xilema durante a onda Pg2 gravada em haste e vagem de soja.

A maioria dos percevejos realizou a forma de onda Pg2 nas três estruturas avaliadas, entretanto, durante o tempo de gravação cerca de metade deles ingeriram seiva do xilema apenas uma vez, não mais que duas. Essa ingestão de seiva está provavelmente relacionada às 18 horas de jejum que os percevejos foram submetidos antes das gravações com EPG. A ingestão de líquido a partir do xilema pode ser uma estratégia usada para evitar a desidratação e para manter o balanço hídrico do corpo, como observado para afídeos, psílídeos (SPILLER et al., 1990; BONANI et al., 2010; POMPON et al., 2010) e percevejos (LUCINI; PANIZZI, 2016).

Da mesma maneira, nós propomos que *P. guildinii* também pode estar usando essa adaptação para superar o estresse, pois é conhecido que essa espécie de percevejo se alimenta preferencialmente no endosperma das sementes, a qual é altamente concentrada em nutrientes (PANIZZI; SLANSKY, 1985b), assim demandando ingestão de mais alimento líquido para balancear a concentração de nutrientes.

Fase de ingestão. Atividades alimentares no endosperma da semente (Pg3). A forma de onda Pg3 foi encontrada apenas durante a alimentação do percevejo em vagens de soja, e não lembra em nada a forma de onda Pg2, a qual foi correlacionada com atividades nos vasos do xilema. Isso sugere que Pg3 provavelmente está correlacionada com salivação e ingestão no endosperma da semente. O dano resultante das atividades alimentares do percevejo no endosperma da semente foi visualmente observado no corte de vagens frescas com uma lâmina.

Durante a onda Pg3a nós observamos que os estiletes foram rapidamente e repetidamente protraídos profundamente dentro do tecido da vagem e parcialmente retraídos. Esse comportamento, chamado “movimento de cabeça” por heteropteristas, foi realizado repetidamente durante essa forma de onda, e é similar à forma de onda Ia gravada para as cigarrinhas *Empoasca fabae* (Harris), e *E. kraemeri* (Ross & Moore) (CALDERON; BACKUS, 1992), com as ondas E1-B e E1-C de *Empoasca vitis* Göthe (JIN et al., 2012) e com a forma de onda B do percevejo *Lygus hesperus* Knight (CLINE; BACKUS, 2002).

Todas essas formas de onda publicadas têm sido correlacionadas com diferentes atividades dos estiletes que ocorrem simultaneamente, tais como, penetração intracelular de inúmeras células, salivação, e atividades de protração/retração dos estiletes nos tecidos

vegetais. Entretanto, nenhuma atividade de ingestão (ou muito raramente) é pensado para ocorrer durante essas formas de onda, ou seja, a principal função dessas atividades é provavelmente romper as células para preparar o local, via mecanismos mecânicos e químicos, para eventos futuros de ingestão.

De maneira similar, *P. guildinii* poderia estar usando essa estratégia para dissolver as células do endosperma. Depieri e Panizzi (2011) observaram que a alimentação de *P. guildinii* em sementes de soja causou a completa dissolução dos corpos proteicos via ação química, ou seja, enzimas salivares secretadas durante períodos de salivação na alimentação. Em *L. hesperus*, Backus et al. (2007) relataram a ocorrência de dilaceração de células pelos estiletes, além disso, a secreção de enzimas na saliva aquosa, por exemplo, poligiaracturonases (SHACKEL et al., 2005), realçariam a ação da ruptura mecânica derivado do movimento dos estiletes.

Durante a forma de onda Pg3b, os estiletes de *P. guildinii* estavam imóveis profundamente dentro do tecido da vagem por um breve período de tempo, e após esse período, os estiletes novamente moveram-se vigorosamente no tecido vegetal (forma de onda Pg3a). Pg3b ocorreu intercalada com a forma de onda Pg3a, entretanto, a duração dos eventos de Pg3b foram muito curtos comparados com eventos de Pg3a. Assim, a forma de onda Pg3b provavelmente representa a ingestão de fluídos de células previamente dilaceradas e maceradas durante a forma de onda Pg3a.

Similarmente, a forma de onda Ic, gravada para *E. fabae* e *E. kraemeri*, está associada com ingestão de fluídos originados da ruptura de células (CALDERON; BACKUS, 1992), a qual também foi observada durante a forma de onda C1 de *L. hesperus* (CLINE; BACKUS, 2002). Essas gravações foram realizadas utilizando um monitor AC com um Ri fixo de 10^6 Ohms (modelo mais antigo), e ambas as formas de onda, Ic e C1, se pareceram como “linhas planas”. De acordo com Cline e Backus (2002), essa resposta sugere que pouca ou nenhuma salivação ocorreu nessas ondas.

Do mesmo modo, nossas observações da forma de onda Pg3b gravada em 10^6 Ohms também foram do tipo “linha plana”, porém, mais detalhes foram fornecidos provavelmente devido a melhor qualidade do equipamento e técnica de gravação. Esse padrão do tipo linha plana poderia ser também ocasionado pela falta de detecção do componente emf em baixos níveis de Ri, pois essa forma de onda é dominada exatamente por esse componente.

É conhecido na literatura que *E. fabae* e *E. kraemeri* usam a estratégia de ruptura de células durante suas atividades alimentares (BACKUS et al., 2005b), originalmente chamado de dilaceramento e descarga (MILES, 1972; CALDERON; BACKUS, 1992). Backus et al.

(2005b) descreveu quatro diferentes “táticas de penetração dos estiletes” dentro da estratégia de ruptura de células. Para *L. hesperus*, Backus et al. (2007), descreveram sua tática como dilaceramento/maceramento e descarga. Assim, *P. guildinii* poderia estar usando uma tática similar de penetração dos estiletes para romper as células do endosperma da semente. Entretanto, isso diferiria de táticas usadas por outros usuários do rompimento de células, por ter uma bainha salivar presente em suas atividades prévias.

Fase de interrupção. Injeção de saliva nos vasos do xilema (Pg4). Nós também relatamos a ocorrência de breves interrupções (onda Pg4) durante a ingestão de seiva dos vasos do xilema (Pg2) em 36% dos percevejos gravados. A forma de onda Pg4 é similar a outras ondas de interrupção discutidas na literatura (nomeada família N) durante a ingestão no xilema, tais como, para as cigarrinhas *H. coagulata* (BACKUS et al., 2005a) (agora *H. vitripennis*) e *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (MIRANDA et al., 2009), para os percevejos blissídeos *B. insularis* e *B. occiduus* (BACKUS et al., 2013), e para o pentatomídeo *E. meditabunda* (LUCINI; PANIZZI, 2016). É possível que as interrupções representem salivação aquosa e testes de células do xilema (BACKUS et al., 2005a, 2013). Assim, as interrupções observadas durante a ingestão do xilema realizado por *P. guildinii* também podem estar relacionadas com a secreção de saliva e teste de células, pois Pg4 (quando observada) ocorreu principalmente no início da ingestão no xilema.

Em conclusão, nossos resultados mostraram que *P. guildinii* ingere conteúdos celulares dos vasos condutores, assim como outros formadores de bainha salivar. Adicionalmente, essa espécie se alimenta nas células vasculares em ambos os estádios, vegetativo (folíolo e haste) e reprodutivo (vagem) da soja, uma vez que folíolo, haste e vagem compartilham os mesmos tecidos, ou seja, parênquima e tecido vascular. A única diferença é que vagem contém endosperma (tecido de reserva da semente), o qual não está presente em folíolo e haste.

P. guildinii ingere exclusivamente seiva dos vasos do xilema e não em elementos crivados do floema, diferindo de afídeos (TJALLINGII, 2006), mosca branca (JANSSEN et al., 1989), cochonilhas (CID; FERERES, 2010), cigarrinhas (SEO et al., 2009; GHAFAR et al., 2011), psilídeos (BONANI et al., 2010; CIVOLANI et al., 2011), percevejos blissídeos (BACKUS et al., 2013), e pentatomídeo *E. meditabunda* (LUCINI; PANIZZI, 2016), nos quais os sítios de ingestão são ambos os tecidos vasculares.

Além disso, *P. guildinii* é há muito tempo conhecido como um importante sugador de sementes, principalmente de soja (PANIZZI; SMITH, 1977). Nós observamos e

sumarizamos dois tipos de formas de onda de ingestão durante as atividades alimentares de *P. guildinii* em vagem de soja, ou seja, endosperma da semente. Para nosso conhecimento, essa é a primeira vez que o comportamento alimentar de um sugador de semente é estudado via EPG.

Esse estudo empregou o novo monitor EPG AC-DC para gerar, pela primeira vez, uma biblioteca de formas de onda para um percevejo pentatomídeo, assim, lançando bases para estudos futuros da alimentação desses percevejos empregando a técnica de EPG. Nós demonstramos que o processo de alimentação do percevejo verde pequeno *P. guildinii* em três diferentes estruturas da planta de soja envolve 11 diferentes tipos de formas de onda com características variáveis. Dessas, duas formas de onda (Pg2 e Pg3b) estão correlacionadas com ingestão. O estudo também elucida que além da ingestão de nutrientes do endosperma da semente (durante Pg3b), a qual é seu sítio principal de alimentação, *P. guildinii* também ingere dos vasos do xilema (durante Pg2) em folíolo, haste e na vagem de soja.

Os resultados desse estudo demonstraram que *P. guildinii* provavelmente usa a estratégia de ruptura celular sem a produção de uma bainha salivar completa para ingerir o conteúdo celular do endosperma de sementes de soja. Assim, fornecendo suporte para a ideia de que a maceração, ocasionada pela atividade salivar, é a causa do dano. Curiosamente, o mesmo inseto pode mudar de estratégia de alimentação e passar a utilizar a bainha salivar para ingerir seiva dos vasos do xilema em folhas e hastes de soja, talvez para hidratação. Portanto, o percevejo provavelmente pode mudar suas estratégias de alimentação para manter um equilíbrio nutricional adequado durante a absorção de alimentos. Essa mudança de estratégia nunca foi documentada via estudos com EPG em percevejos, logo, isso será útil para o entendimento das causas dos danos e o desenvolvimento de variedades de soja mais tolerantes, em estudos futuros.

4.5 Referências

- BACKUS, E. A.; HABIBI, J.; YAN, F.; ELLERSIECK, M. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implications for transmission of *Xylella fastidiosa*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, p. 787-813, 2005a.
- BACKUS, E. A.; SERRANO, M. S.; RANGER, C. M. Mechanisms of hopperburn: An overview of insect taxonomy, behavior, and physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 125-151, 2005b.

BACKUS, E. A.; BENNETT, W. H. The AC-DC Correlation Monitor: new EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing-sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 869-884, 2009.

BACKUS, E. A.; CLINE, A. R.; ELLERSEICK, M. R.; SERRANO, M. S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 100, p. 296-310, 2007.

BACKUS, E. A.; RANGASAMY, M.; STAMM, M.; MCAUSLANE, H. J.; CHERRY, R. Waveform library for chinch bugs (Hemiptera: Heteroptera: Blissidae): characterization of electrical penetration graph waveforms at multiple input impedances. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, p. 524-539, 2013.

BAUR, M. E.; BALDWIN, J. Red banded stink bug trouble in Louisiana. **Louisiana Agriculture**, v. 49, p. 9-10, 2006.

BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DAGLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, p. 35-49, 2010.

BONJOUR, E. L.; FARGO, W. S.; WEBSTER, J. A.; RICHARDSON, P. E.; BRUSEWITZ, G. H. Probing behavior comparisons of squash bugs (Heteroptera: Coreidae) on cucurbit hosts. **Environmental Entomology**, v. 20, p. 143-149, 1991.

CALDERON, J. D.; BACKUS, E. A. Comparison of the probing behaviors of *Empoasca fabae* and *E. kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) on resistant and susceptible cultivars of common beans. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 88-99, 1992.

CERVANTES, F. A.; BACKUS, E. A.; GODFREY, L.; AKBAR, W.; CLARK, T. L. Characterization of an EPG waveform library for adult *Lygus lineolaris* and *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton squares. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 684-697, 2016.

CID, M.; FERERES, A. Characterization of the probing and feeding behavior of *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) on grapevine. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, p. 404-417, 2010.

CIVOLANI, S.; LEIS, M.; GRANDI, G.; GARZO, E.; PASQUALINI, E.; MUSACCHI, S.; CHICCA, M.; CASTALDELLI, G.; ROSSI, R.; TJALLINGII, W. F. Stylet penetration of *Cacopsylla pyri*; an electrical penetration graph (EPG) study. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 1407-1419, 2011.

CLINE, A. R.; BACKUS, E. A. Correlations among AC electronic monitoring waveforms, body postures, and stylet penetration behaviors of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). **Environmental Entomology**, v. 31, p. 538-549, 2002.

COOK, C. A.; NEAL, J. J. Feeding behavior of larvae of *Anasa tristis* (Heteroptera: Coreidae) on pumpkin and cucumber. **Environmental Entomology**, v. 28, p. 173-177, 1999.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; AZEVEDO, J. Soybean seed damage by different species of stink bugs. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, p. 145-150, 2002.

DEPIERI, R. A.; PANIZZZI, A. R. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, p. 197-203, 2011.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v. 11, p. 929-930, 1971.

GHAFFAR, M. B. B. A.; PRITCHARD, J.; FORD-LLOYD, B. Brown planthopper (*N. lugens* Stål) feeding behaviour on rice germplasm as an indicator of resistance. PLoS ONE 6: e22137. doi:10.1371/journal.pone.0022137, 2011.

JANSSEN, J. A. M.; TJALLINGII, W. F.; VAN LENTEREN, J. C. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 52, p. 69-81, 1989.

JIN, S.; CHEN, Z. M.; BACKUS, E. A.; SUN, X. L.; XIAO, B. Characterization of EPG waveforms for the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), on tea plants and their correlation with stylet activities. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 1235-1244, 2012.

KAMMINGA, K. L.; DAVIS, J. A.; STOCK, S. P.; RICHTER, A. R. First report of a mermithid nematode infecting *Piezodorus guildinii* and *Acrosternum hilare* (Hemiptera: Pentatomidae) in the United States. **Florida Entomologist**, v. 95, p. 214-217, 2012.

LUCINI, T.; PANIZZZI, A. R. Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa mediatubunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring pentatomids for EPG. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, p. 118-132, 2016.

MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, v. 202, p. 1358-1359, 1964.

MILES, P. W. The saliva of Hemiptera. **Advances in Insect Physiology**, v. 9, p. 183-255, 1972.

MIRANDA, M. P.; FERERES, A.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of *Bucephalogonia xanthophis*, a vector of *Xylella fastidiosa* in citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 35-46, 2009.

PANIZZZI, A. R.; SLANSKY JR, F. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. **Florida Entomologist**, v. 68, p. 184-214, 1985a.

PANIZZI, A. R.; SLANSKY JR, F. Legume host impact on performance of adult *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, v. 14, p. 237-242, 1985b.

PANIZZI, A. R.; SMITH, J. G. Biology of *Piezodorus guildinii*: Oviposition, development time, adult sex ratio and longevity. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 70, p. 35-39, 1977.

POMPON, J.; QUIRING, D.; GIORDANENGO, P.; PELLETIER, Y. Role of xylem consumption on osmoregulation in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 610-615, 2010.

RANGASAMY, M.; MCAUSLANE, H. J.; BACKUS, E. A.; CHERRY, R. H. Differential probing behavior of *Blissus insularis* (Hemiptera: Blissidae) on resistant and susceptible St. Augustine grasses. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, p. 780-788, 2015.

SEO, B. Y.; KNOW, Y. H.; JUNG, J. K.; KIM, G. H. Electrical penetration graphic waveforms in relation to the actual positions of the stylet tips of *Nilaparvata lugens* in rice tissue. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 12, p. 89-95, 2009.

SHACKEL, K. A.; CELORIO-MANCERA, M. P.; AHMADI, H.; GREVE, L. C.; TEUBER, L. R.; BACKUS, E. A.; LABAVITCH, E. A. Micro-injection of *Lygus* salivary gland proteins to simulate feeding damage in alfalfa and cotton flowers. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 58, p. 69-83, 2005.

SPILLER, N. J.; KOENDERS, L.; TJALLINGII, W. F. Xylem ingestion by aphids - a strategy for maintaining water balance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 55, p. 101-104, 1990.

TJALLINGII, W. F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, p. 721-730, 1978.

TJALLINGII, W. F. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 739-745, 2006.

VYAVHARE, S. S.; WAY, M. O.; MEDINA, R. F. Stink bug species composition and relative abundance of the redbanded stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean in the Upper Gulf Coast Texas. **Environmental Entomology**, v. 43, p. 1621-1627, 2014.

CAPÍTULO V

Comportamento alimentar do percevejo barriga verde *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) em plântulas de milho (*Zea mays* L.): um estudo de EPG em múltiplas impedâncias de entrada e correlações histológicas

5.1 Introdução

O percevejo barriga verde *Dichelops melacanthus* Dallas é um pentatomídeo neotropical amplamente distribuído no Brasil e em outros países da América do Sul (GRAZIA, 1978; PANIZZI, 2015). A ocorrência desta espécie é mais comum em campos de cultivo de soja *Glycine max* (L.), trigo *Triticum aestivum* L., e milho *Zea mays* (L.). O ataque desse percevejo na cultura do milho tem aumentado no Brasil após o seu primeiro relato no estado do Mato Grosso do Sul, em 1995 (ÁVILA; PANIZZI, 1995). Atualmente, encontra-se espalhado em importantes regiões produtoras desse cereal no Brasil.

Há duas principais razões para o aumento desta espécie em campos de milho. A primeira está relacionada ao aumento do uso de sistemas de plantio direto associados com a semeadura de segunda safra (chamada de safrinha), principalmente de milho, após a colheita da safra de verão (CHOCOROSQUI; PANIZZI, 2004). A segunda razão é o aumento significativo dos campos cultivados com híbridos de milho com tecnologia Bt (genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) inserido em plantas cultivadas, como o milho), a qual permitiu reduzir a aplicação de inseticidas de amplo espectro para controle de lagartas. A aplicação desses inseticidas, indiretamente reduziam as populações de insetos pragas não alvos, tais como percevejos, abaixo do nível de controle. Na região sudeste dos Estados Unidos, a população de *Euschistus servus* (Say) aumentou na cultura do algodão a partir da utilização de cultivares Bt em campo (GREENE et al., 2001).

Em milho, *D. melacanthus* alimenta-se próximo ao solo em colmos de plantas em estádios iniciais de desenvolvimento (plântula), onde injeta saliva tóxica e suga o conteúdo das células durante suas atividades de alimentação, causando sérios danos a planta. Devido ao aumento gradual da sua ocorrência, tornando-se uma praga primária na cultura do milho (principalmente nas culturas Bt), mais estudos são necessários para elucidar o comportamento alimentar deste percevejo e também encontrar algumas ferramentas para reduzir os danos.

Atualmente, a técnica conhecida como gráfico de penetração elétrica ou eletropenetrografia (abreviados como EPG) desenvolvido por McLean e Kinsey (1964), e melhorado por Tjallingii (1978) tem permitido desvendar com precisão as atividades dos estiletes realizadas por insetos sugadores internamente nos tecidos de plantas durante suas atividades alimentares. Nesta técnica, uma corrente elétrica passa pela planta e pelo inseto sugador, e volta ao monitor de EPG. No momento em que o inseto insere os seus estiletes no tecido da planta eletrificada, o circuito é fechado e as formas de onda são registradas (TJALLINGII, 1978, 1985; WALKER, 2000).

Hoje em dia, vários pesquisadores ao redor do mundo têm feito uso desta ferramenta para aprofundar os seus conhecimentos sobre o comportamento alimentar e outras informações valiosas de insetos sugadores, tais como pulgões, cigarrinhas, psílídeos e percevejos (por exemplo, PRADO; TJALLINGII, 1994; ALMEIDA; BACKUS, 2004; BONANI et al., 2010; CEN et al., 2012; JIN et al., 2012; BACKUS et al., 2013; LUCINI; PANIZZI, 2016; LUCINI et al., 2016). Estes dois últimos estudos avaliaram o comportamento alimentar de duas espécies de percevejos pentatomídeos neotropicais, *Edessa meditabunda* (F.) e *Piezodorus guildinii* (Westwood), respectivamente, em plantas de soja.

Aqui, usamos o mais recente monitor de EPG AC-DC (BACKUS; BENNETT, 2009). Este novo monitor permite obter gravações de EPG aplicando ambos os sinais AC (corrente alternada) e DC (corrente direta). Além disso, alterações nos níveis de impedâncias de entrada - R_i (variando de 10^6 a 10^{13} Ohms) podem ser feitas durante a gravação, o que permite identificar as origens elétricas de cada forma de onda baseado nas alterações de sua aparência e amplitude. Dito isto, a definição da origem elétrica de uma forma de onda fornece suporte para definir o seu significado biológico.

Sendo assim, os objetivos deste estudo foram 1) caracterizar e elucidar todas as formas de onda de EPG produzidas por *D. melacanthus* alimentando-se em plântulas de milho em diferentes níveis de R_i , para criar uma biblioteca de formas de onda, 2) determinar as origens elétricas das formas de onda, a fim de hipotetizar sobre os seus significados biológicos, e 3) realizar estudos histológicos para determinar os locais de alimentação explorados pelo percevejo, permitindo determinar o significado biológico de cada forma de onda com maior precisão.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Colônia de insetos e obtenção das plantas de milho

Colônias de *D. melacanthus* foram estabelecidas no laboratório de Entomologia da Embrapa Trigo em Passo Fundo, RS, Brasil (28° 15'S; 52° 24'O). Os percevejos foram coletados em plantas de soja cultivadas em um campo comercial de Francisco Beltrão, Paraná, Brasil (26° 04'S; 53° 03'O), e mantidos dentro de caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) com vagens frescas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) como alimento. Depois disso, os percevejos foram levados para o laboratório e colocados em gaiolas de criação (25 x 20 x 20 cm), forradas com papel filtro. As gaiolas foram mantidas em sala de criação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 de luz: escuro, respectivamente.

Uma fonte de alimento padrão, composta por uma mistura de vagens de feijão verde, amendoim cru e sem casca (*Arachis hypogaea* L.), sementes maduras de soja, frutos (bagas) de ligustro (*Ligustrum lucidum* Ait.), e plântulas de milho foram fornecidos aos percevejos. Essa foi substituída, duas vezes por semana. Durante este momento, os ovos foram recolhidos e colocados no interior de caixas gerbox para o desenvolvimento das ninfas até a obtenção dos adultos para utilizar nos experimentos.

Sementes de milho cv. P1630 H (sementes Pioneer®) foram semeadas semanalmente em copos plásticos (100 ml) e mantidos em casa de vegetação (Figura 1). Plantas com duas ou três folhas completamente desenvolvidas [estádio V2 - V3, Ritchie e Hanway (1989)], foram separadas e usadas apenas uma vez nas gravações de EPG, e depois descartadas.



Figura 1 - Plântulas de milho semeadas de forma escalonada em copos plásticos descartáveis (100 ml) e mantidos em casa de vegetação.

5.2.2 Gravações de EPG e aquisição dos dados

Para gravar o comportamento alimentar de fêmeas adultas de *D. melacanthus*, um monitor EPG AC-DC de quatro canais (BACKUS; BENNETT, 2009; EPG Technologies, Inc., Gainesville, FL, EUA) foi utilizado. Cada inseto foi mantido sobre a planta durante ~10 h, e monitorado ininterruptamente em condições de laboratório e de luz contínua. Insetos, plantas, e os quatro amplificadores (canais) foram mantidos dentro de uma gaiola de Faraday, para proteger o sistema contra o ruído elétrico externo. Em seguida, cada percevejo foi ligado a um amplificador individualmente e posicionado sobre o colmo da plântula de milho (local preferencial de alimentação), e para fechar o circuito elétrico, o eletrodo de cobre da planta (\pm 3 cm de comprimento) foi inserido no solo contendo cada planta (Figuras 2A, B).

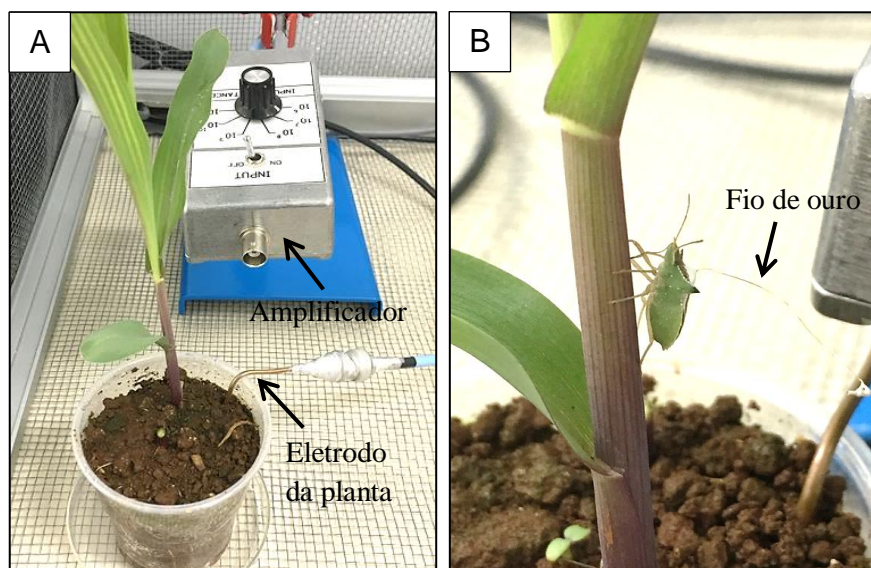


Figura 2 - Detalhe do circuito elétrico e do percevejo pentatomídeo *Dichelops melacanthus* durante a gravação de suas atividades alimentares. Plântula de milho (estádio V2-V3) conectado ao circuito elétrico por meio do eletrodo da planta e o amplificador, no qual o percevejo é conectado ao circuito (A). Fêmea adulta de *D. melacanthus* presa no fio de ouro durante a gravação de seu comportamento alimentar no colmo de plântula de milho (B).

Antes de iniciar as gravações do EPG, fêmeas do percevejo barriga-verde foram retiradas da colônia de criação, e colocadas em uma pequena caixa de plástico e mantidas em jejum por cerca de 15 horas. Após esse período, os percevejos foram conectados ao fio de ouro de acordo com a metodologia proposta por Lucini e Panizzi (2016).

As mudanças nos componentes elétricos, isto é, resistência (R) e a força eletromotriz (emf), registradas durante o comportamento dos estiletes na planta foram amplificadas, retificados, e digitalizados a uma taxa de amostragem de 100 Hz por canal utilizando o Windaq DI-710 (DATAQ Instruments, Akron, OH) e gravados usando um notebook HP Pentium com software Windaq Lite (DATAQ) instalado. Ajustes para manter a onda nativa após a retificação foram obtidos por meio do controle “Offset” do monitor e as configurações para a ótima visualização das formas de onda foram ajustadas de acordo com a necessidade (BACKUS; BENNETT, 2009). Para caracterizar as formas de onda, foram considerados os seguintes aspectos: forma, frequência, amplitude, e origem elétrica, isto é, os componentes R e emf, e outros trabalhos com insetos sugadores, principalmente percevejos, como feito por Lucini e Panizzi (2016) e Lucini et al. (2016).

5.2.3 Desenho experimental

Basicamente as gravações de EPG para *D. melacanthus* foram divididas em dois experimentos, como segue. No primeiro, foram utilizados quatro níveis diferentes de impedância de entrada (R_i), 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 Ohms, e aplicada uma voltagem de 50 mV de corrente alternada (AC) para todos os níveis de R_i . Sessenta e quatro fêmeas adultas foram gravadas com êxito neste experimento. O segundo teve como objetivo determinar o componente principal ou a origem elétrica de cada forma de onda, isto é, o componente R, emf ou ambos. Para isso, todos os percevejos gravados ($n = 13$) começaram em R_i 10^7 Ohms e durante a gravação de uma forma de onda específica, mudanças nos níveis de R_i foram feitas para R_i 10^8 , 10^9 e 10^{10} Ohms. Isto porque, em níveis baixos de R_i o componente R é mais enfatizado, enquanto que em níveis elevados de R_i o componente emf é mais acentuado (BACKUS; BENNETT, 2009).

5.2.4 Análises histológicas do tecido vegetal

As correlações entre a posição da ponta dos estiletes e/ou da bainha salivar de *D. melacanthus* no colmo de plântulas de milho e as diferentes formas de onda observadas durante as gravações de EPG foram feitas via estudos histológicos. Para isso, um conjunto de fêmeas adultas foi gravado em R_i 10^7 Ohms e 50 mV de sinal AC. Quando uma forma de onda específica foi observada na tela do computador, o monitor de EPG foi desligado e os estiletes foram cuidadosamente cortados usando uma micro tesoura entomológica. Em

seguida, o tecido vegetal foi processado para preparar as lâminas semi-permanentes de acordo com a metodologia aplicada por Lucini e Panizzi (2016).

Para fazer os cortes histológicos, usou-se plantas de milho em fase de desenvolvimento V5-V6 [cinco-seis folhas completamente desenvolvidas - Ritchie e Hanway (1989)]. As plantas de milho jovens (estádio V2-V3) têm seus colmos compostos por bainhas foliares enroladas (sobrepostas) uma sobre a outra. Ou seja, há espaços vazios entre elas, o que dificulta manter as folhas ligadas uma à outra e também os estiletes imóveis quando os mesmos são cortados utilizando a metodologia proposta. Por outro lado, nas plantas de milho mais desenvolvidas o colmo é sólido, permitindo cortar o tecido vegetal mais facilmente. Além do mais, as formas de onda gravadas em ambos os estádios de desenvolvimento foram similares. A posição da ponta dos estiletes e/ou da bainha salivar no colmo de milho foi determinada com base em sete espécimes para cada forma de onda (Dm1, Dm2 e Dm3a). Imagens digitais foram capturadas, utilizando um microscópio Olympus BX50 (Shinjuku, Tokyo, Japão) acoplado a uma câmera de vídeo Sony DXC 107A (Minato, Tokyo, Japan), ligado a um computador.

5.3 Resultados

5.3.1 Caracterização das formas de onda

Visão geral das formas de onda gravadas para o percevejo *Dichelops melacanthus*. As formas de onda gravadas durante as atividades alimentares de *D. melacanthus* em plântulas de milho incluem ondas relacionadas com atividades de 1) não alimentação e 2) alimentação. Durante as gravações, foram distinguidas sete formas de onda agrupadas em três fases: não alimentação, inserção e penetração dos estiletes, e ingestão. Três dessas ondas representaram as atividades de não alimentação: Np, Z e O, e quatro as atividades de alimentação: Dm1, Dm2, Dm3a e Dm3b. As ondas de alimentação, foram agrupadas em duas famílias diferentes: P - inserção e penetração dos estiletes no tecido vegetal e I - ingestão (Tabela 1).

A família P foi composta por apenas uma forma de onda, chamada Dm1, e a família I englobou três formas de onda, nomeadas Dm2, Dm3a e Dm3b. Os tipos de ondas foram nomeados por Dm (*Dichelops melacanthus*) seguido de um número e subtipos por uma letra minúscula adicional, tal como aplicado por Lucini e Panizzi (2016) e Lucini et al. (2016) estudando outras espécies de pentatomídeos. As características das formas de onda de não alimentação e de alimentação estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sumário das formas de onda EPG AC-DC, suas principais características elétricas, e atividades biológicas propostas para cada forma de onda gravada durante o comportamento alimentar de *Dichelops melacanthus* em colmos de plântulas de milho.

Fase	Família	Tipo ou subtipo	Amplitude relativa (%)		Frequência (Hz)		Origem elétrica	Atividade biológica proposta
			Ri 10 ⁷	Ri 10 ⁹	Ri 10 ⁷	Ri 10 ⁹		
Não-alimentação	-	Np	Baixo-médio	Médio-alto	Irregular	Irregular	Principalmente emf/algum R	Caminhando sobre a superfície do colmo
	-	Z	Muito baixo	Muito baixo	-	-	-	Parado na superfície do colmo
	-	O*	-	-	-	-	-	Postura de ovos no colmo
Inserção e penetração dos estiletes	P	Dm1	100	100	Irregular	Irregular	R-dominado; mas algum emf	Penetração profunda dos estiletes no tecido vegetal e secreção da bainha salivar
Ingestão	I	Dm2	39 (13-84)	54 (25-84)	4,2 Hz (3,3-5,1)	4,0 Hz (3,5-4,8)	Mistura; pico = R/emf; onda = emf	Ingestão de seiva do xilema
Salivação/ ingestão	I	Dm3a	80 (43-100)	45 (20-100)	3,8 Hz (3,3-4,4)	3,9 Hz (3,3-5,1)	Principalmente R, mas também emf	Dilaceramento mecânico de células, maceração enzimática dos tecidos e ingestão
Ingestão	I	Dm3b	11 (7-17)	15 (9-20)	5,2 Hz (5,1-5,3)	5,3 Hz (4,5-5,8)	emf	Curto período de ingestão

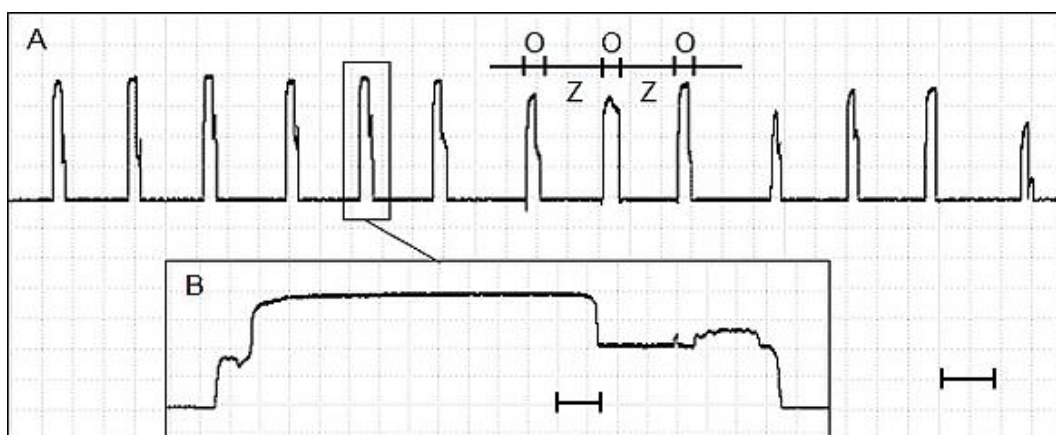
*Observado durante uma única gravação em 10⁶ Ohms.

Ondas de não alimentação. Durante as atividades de não alimentação, três formas de onda distintas foram visualmente caracterizadas e correlacionadas com suas atividades biológicas, como segue.

Forma de onda Z. Sempre foi observado quando o percevejo estava parado sobre a superfície da planta. Essa forma de onda não apresentou qualquer alteração visível na sua aparência quando gravada nos diferentes níveis de impedância (R_i), além disso, apresenta uma amplitude muito baixa, tal como uma “linha plana”. Assim, a onda Z representada a linha de base da gravação (Tabela 1, Figuras 3A, 4A).

Forma de onda Np. Foi semelhante em aparência quando gravada nos diferentes níveis de R_i , no entanto, foi muito mais visível em R_i mais elevadas (10^8 e 10^9 Ohms) comparado com níveis mais baixos de R_i . Isso sugere que a onda Np apresenta um forte componente emf, porém o componente R também esteve presente. Np foi visualmente correlacionada com o percevejo caminhando sobre a superfície da planta, mostrando um nível de amplitude variável de acordo com o nível de R_i aplicado. Por exemplo, em 10^7 Ohms apresentou de baixa a média amplitude, enquanto que em 10^9 Ohms apresentou de média a alta amplitude e com vários picos irregulares (Tabela 1, ver Figuras 6A, 7A).

Forma de onda O. Essa forma de onda foi observada durante a gravação em apenas um percevejo, o qual estava sendo monitorado aplicando um R_i de 10^6 Ohms. Essa onda foi composta de um único pico de grande amplitude e de longa duração (Figuras 3A, B). Além do mais, foi visualmente correlacionada com a deposição de ovos pela fêmea na superfície do colmo de milho (Figura 3C).



Continua ...

Continuação Figura 3



Figura 3 - Forma de onda “O” gravada para o percevejo *Dichelops melacanthus* sobre o colmo da plântula de milho aplicando um Ri de 10^6 Ohms. Múltiplas ondas “O”, intercaladas com ondas “Z”, a qual representa a postura de ovos por fêmeas de *D. melacanthus* no colmo de milho (A). Detalhe de uma única onda “O” (B). Detalhe dos ovos ovipositados no colmo de milho durante a gravação de EPG (C). Figura A tem Windaq compressão 300 [60 s/divisão vertical], ganho de 2x. B tem compressão 7 [1,4 s/divisão vertical], ganho de 2x. Figura A = barra de escala equivale a 100s, figura B = barra de escala equivale a 2s.

Ondas de alimentação. Duas principais famílias de formas de onda (P e I) foram descritas durante as atividades de alimentação de *D. melacanthus* em plântulas de milho. Estas foram compostas por três tipos, assim nomeadas Dm1, Dm2 e Dm3. Essa última foi dividida em dois subtipos diferentes, denominados Dm3a e Dm3b.

Fase de inserção e penetração dos estiletes. Família P (Dm1). Esta fase, representada por apenas uma forma de onda - Dm1, foi visível em todos os níveis de Ri aplicados (10^6 a 10^9 Ohms). Foi caracterizada pela queda repentina do nível de voltagem após a inserção dos estiletes no tecido vegetal, ou seja, apresentou um sinal negativo (Figuras 4-7A, B). Em Ri de 10^6 Ohms, foi observado, algumas vezes, que o nível de voltagem aumentou após a inserção, isto é, mostrando um sinal positivo. Dm1 foi mais bem distinguida em níveis de Ri mais baixos (10^6 e 10^7 Ohms), por isso essa forma de onda teve como origem elétrica, principalmente, o componente R, embora o componente emf também esteja presente. Além disso, Dm1 mostrou uma amplitude elevada, o maior valor entre todas as formas de onda registradas, mostrando picos irregulares, isto é, sem um padrão distinguível (Tabela 1).

Durante essa forma de onda, foi observado visualmente que os estiletes estavam inseridos profundamente no tecido do colmo de milho. Além do mais, supõe-se que ocorra a secreção da bainha salivar, pois ocasionalmente, foi observada a secreção de flanges (saliva geleificante) externamente no tecido do colmo após os estiletes terem sido retirados. Em todos os níveis de Ri, Dm1 sempre foi gravado antes da forma de onda Dm2 (representa a ingestão

de seiva dos vasos do xilema, ver mais tarde), e, além disso, essas duas ondas foram facilmente distinguidas uma da outra (Figuras 4A, B; 6A-C).

Por outro lado, a mesma forma de onda Dm1 foi, por vezes, gravada antes da onda Dm3 (representa as atividades de dilaceramento/ maceramento e a ingestão do conteúdo celular, ver mais adiante) (Figuras 5B, 7B). Entretanto, ocasionalmente essas duas ondas não foram claramente separadas uma da outra durante as gravações.

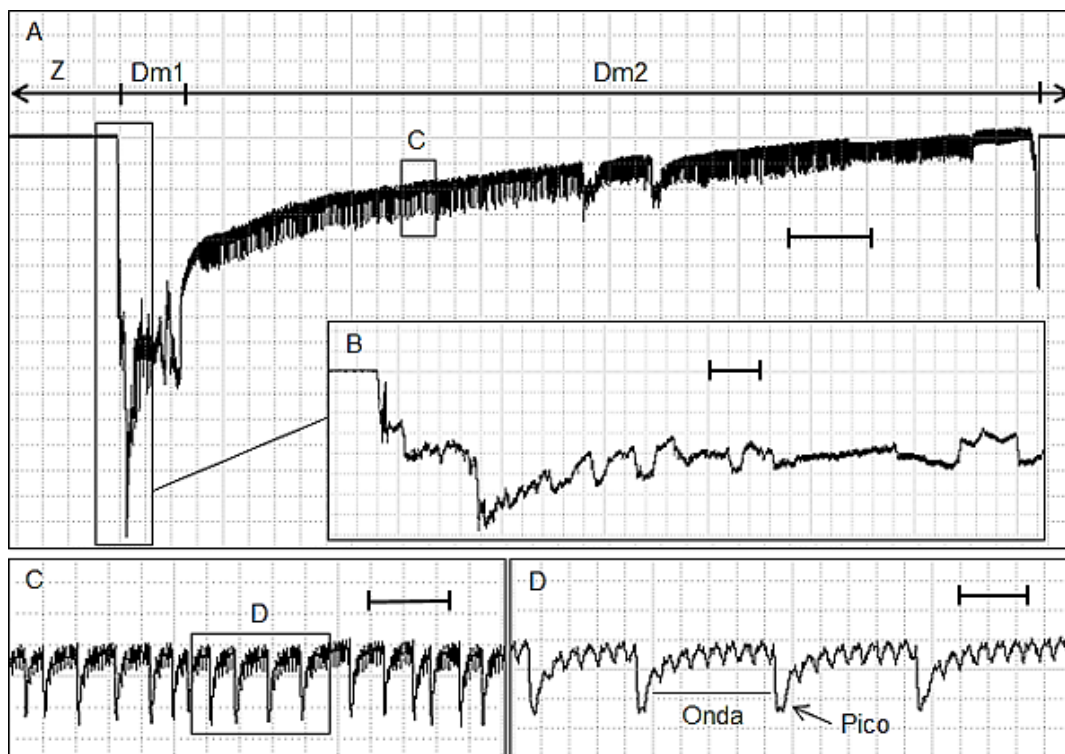


Figura 4 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares do percevejo *Dichelops melacanthus* em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Visualização comprimida de um evento de alimentação (~18 min) mostrando a onda de não alimentação Z (percevejo parado) e as ondas de alimentação Dm1 (inserção e penetração dos estiletes) e Dm2 (ingestão de seiva do xilema) (A). Visualização expandida da forma de onda Dm1 (B). Visualização expandida da forma de onda Dm2, e em D é definido a porção dos picos e das ondas (C, D). Figura A tem Windaq compressão 150 [30 s/divisão vertical], ganho de 16x. B tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 8x. C tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 16x. D tem compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho de 16x. Figura A = barra de escala equivale a 100s, figuras B, C = barra de escala equivale a 5s, figura D = barra de escala equivale a 1s.

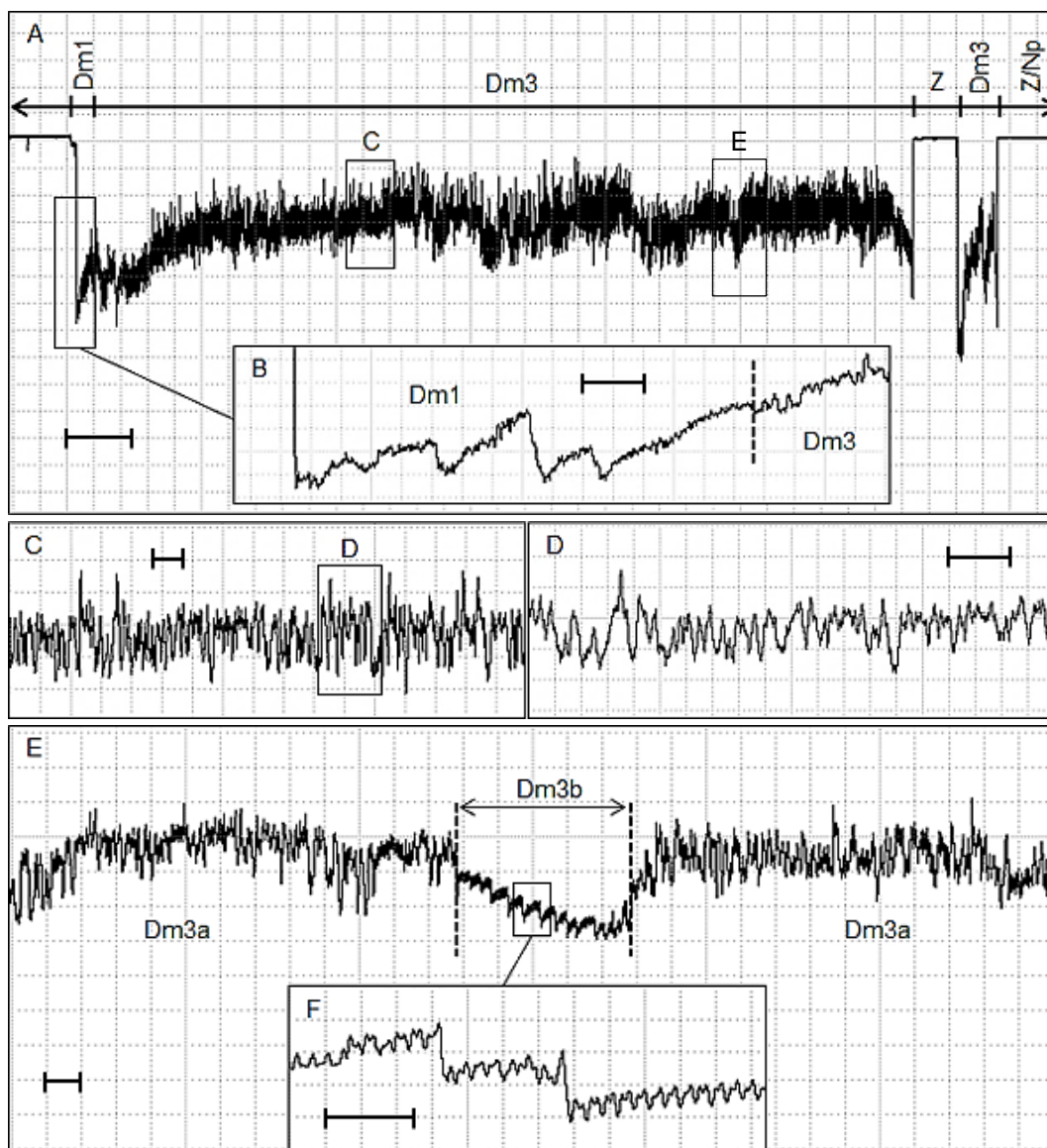


Figura 5 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares do percevejo *Dichelops melacanthus* em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Visualização comprimida de um evento de alimentação (~21 min) mostrando a onda de não alimentação Z (percevejo parado) e ondas de alimentação Dm1 (inserção e penetração dos estiletes) e Dm3 (atividades de dilaceramento/ maceramento e ingestão) (A). Visualização expandida da forma de onda Dm1 e início da forma de onda Dm3 (B). Visualização expandida da forma de onda Dm3a (C, D). Detalhe das formas de onda Dm3a e Dm3b (E). Visualização expandida da forma de onda Dm3b (F). Figura A tem Windaq compressão 200 [40 s/divisão vertical], ganho de 8x. B tem compressão 5 [1 s/divisão vertical], ganho de 32x. C tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 16x. D tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 16x. E tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 8x. F tem compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho de 16x. Figura A = barra de escala equivale a 100s, figuras B-E = barra de escala equivale a 2s, figura F = barra de escala equivale a 1s.

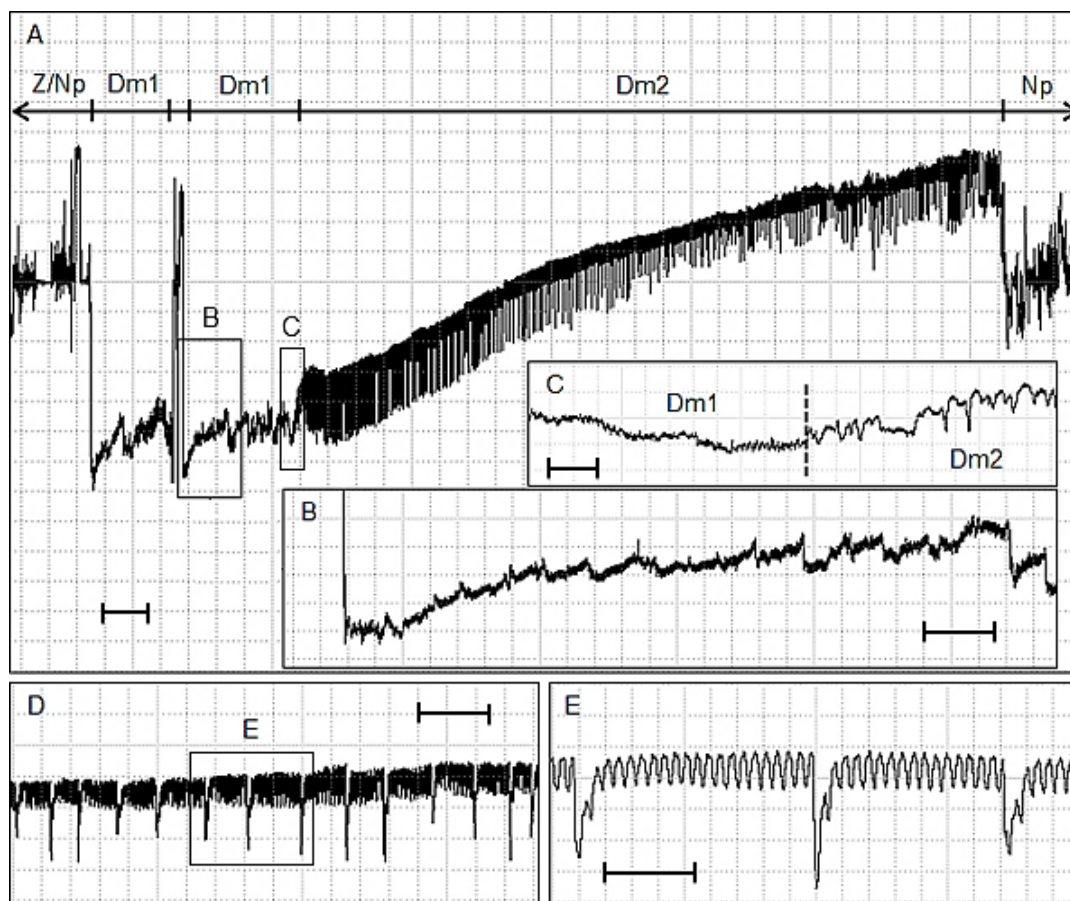


Figura 6 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares do percevejo *Dichelops melacanthus* em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) aplicando um Ri de 10^9 Ohms. Visualização comprimida de eventos de alimentação (~32 min) mostrando as ondas de não alimentação Z e Np (percevejo parado e movendo-se, respectivamente), e dois eventos da onda Dm1 (inserção e penetração dos estiletes) e um evento da onda Dm2 (ingestão de seiva do xilema) (A). Visualização expandida da forma de onda Dm1 (B). Visualização expandida da forma de onda Dm1 e início da forma de onda Dm2 (C). Visualização expandida da forma de onda Dm2 (D, E). Figura A tem Windaq compressão 300 [60 s/divisão vertical], ganho de 4x. B tem compressão 20 [4 s/divisão vertical], ganho de 8x. C tem compressão 5 [1 s/divisão vertical], ganho de 8x. D tem compressão 20 [4 s/divisão vertical], ganho de 8x. E tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 8x. Figura A = barra de escala equivale a 100s, figuras B, D = barra de escala equivale a 10s, figuras C, E = barra de escala equivale a 2s.

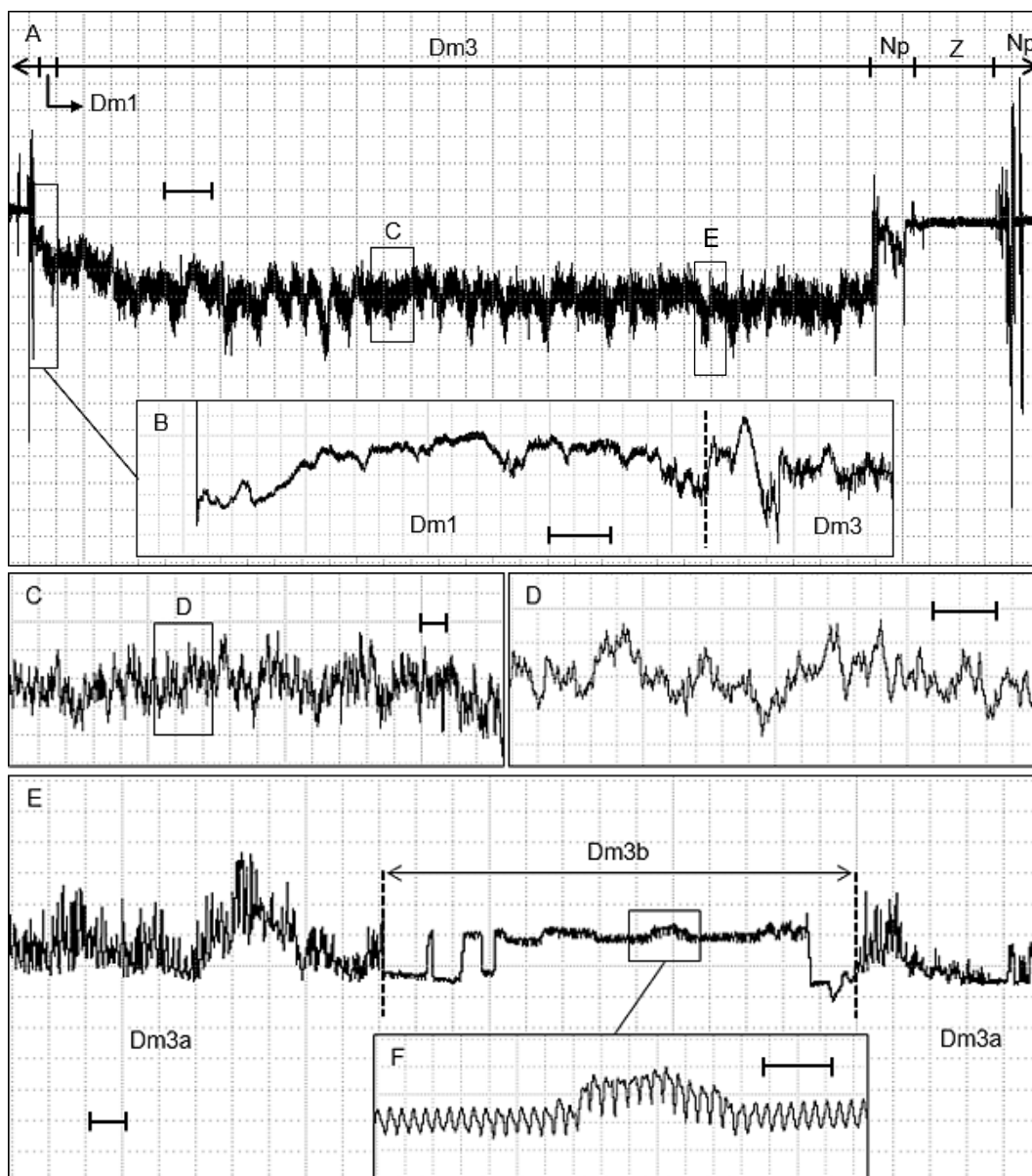


Figura 7 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares do percevejo *Dichelops melacanthus* em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) aplicando um Ri de 10^9 Ohms. Visualização comprimida de um evento de alimentação (~31 min) mostrando as ondas de não alimentação Z e Np (percevejo parado e movendo-se, respectivamente) e as ondas de alimentação Dm1 (inserção e penetração dos estiletes) e Dm3 (atividades de dilaceramento/ maceramento) (A). Visualização expandida da forma de onda Dm1 e início da forma de onda Dm3 (B). Visualização expandida da forma de onda Dm3a (C, D). Detalhe das formas de onda Dm3a e Dm3b (E). Visualização expandida da forma de onda Dm3b (F). Figura A tem Windaq compressão 300 [60 s/divisão vertical], ganho de 32x. B tem compressão 20 [4 s/divisão vertical], ganho de 16x. C tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 64x. D tem compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho de 64x. E tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 4x. F tem compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho de 16x). Figura A = barra de escala equivale a 100s, figura B = barra de escala equivale a 10s, figuras C, E = barra de escala equivale a 2s, figura D, F = barra de escala equivale a 1s.

Fase de ingestão. Família I (Dm2, Dm3a e Dm3b). A família I foi composta por três formas de onda diferentes, chamadas de Dm2, Dm3a e Dm3b. A forma de onda Dm2 sempre ocorreu após Dm1 (Figuras 4A, 6A). Durante a transição entre as ondas Dm1 e Dm2, geralmente, foi observado um pequeno aumento do nível de voltagem (Figura 6C), porém, às vezes, houve diminuição da mesma. Dm2 foi um padrão repetitivo composto por ondas intercaladas com picos (picos e ondas são definidos na Figura 4D).

A amplitude e a orientação do pico variaram entre os diferentes níveis de Ri aplicados. Por exemplo, em algumas gravações aplicando um Ri de 10^6 Ohms, o pico estava voltado para cima, enquanto que em outros níveis de Ri (10^7 a 10^9 Ohms) os picos foram predominantemente orientados para baixo (Figuras 4C, D; 6D, E). Esta inversão não foi devido aos ajustes de retificação (ver materiais e métodos). Em relação à amplitude, foi observado um aumento do seu valor à medida que os níveis de Ri aumentaram, por exemplo, 10^7 Ohms apresentou de baixo a médio valor de amplitude (média de 39%), enquanto que em 10^9 Ohms foi de médio a alto valor (média de 54%). No entanto, a frequência de Dm2 não foi grandemente afetada, a qual apresentou um padrão altamente regular de 4,2 Hz (variando de 3,3 a 5,1) e 4,0 Hz (variando de 3,5 e 4,8) em Ri 10^7 e 10^9 Ohms, respectivamente (Tabela 1).

Quando avaliada a origem elétrica da onda de Dm2, observou-se que em níveis baixos de Ri (10^6 e 10^7 Ohms), ambas as porções, picos e ondas, apresentaram baixa amplitude, mas ambas ainda eram visíveis. Por outro lado, em altos níveis de Ri (10^9 e 10^{10} Ohms) a porção da onda foi mais fortemente enfatizada (amplitude aumentou) em comparação com os níveis baixos de Ri, assim como os picos, que também tiveram sua amplitude aumentada (Figuras 8A-D). Esses resultados indicam que os picos apresentaram uma mistura de ambos os componentes, R e emf, enquanto que na porção das ondas o componente emf foi mais dominante.

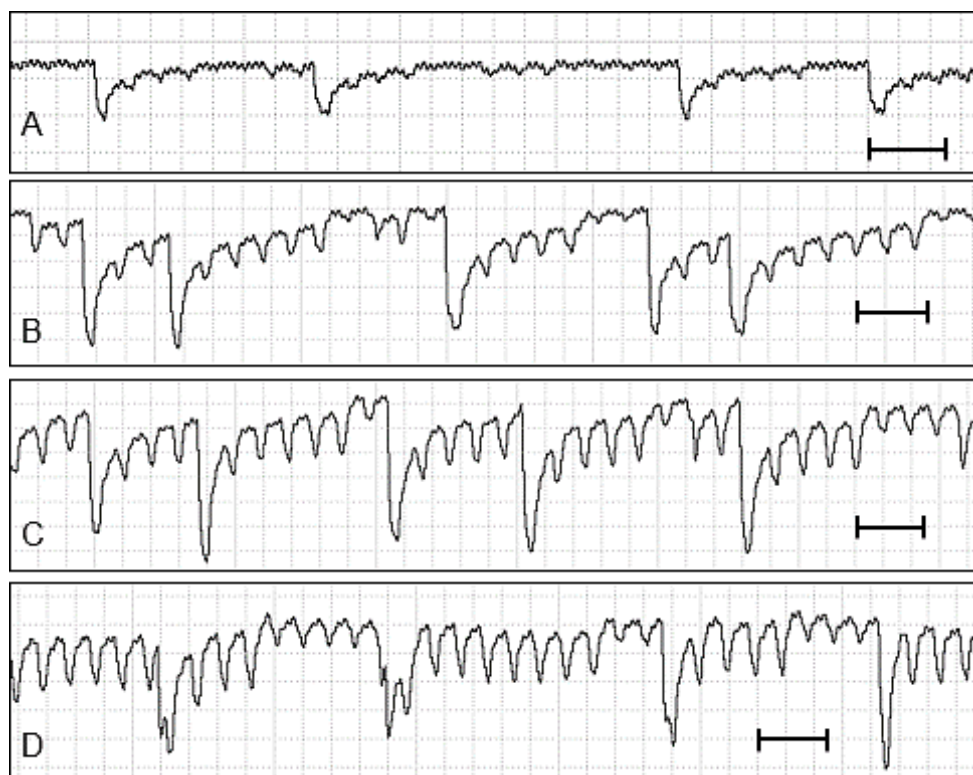


Figura 8 - Forma de onda Dm2 de *Dichelops melacanthus* gravada em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) em quatro diferentes níveis de impedância de entrada (R_i). A = 10^7 , B = 10^8 , C = 10^9 , D = 10^{10} Ohms. Figuras A-D tem Windaq compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho de 16x. Figuras A-D = barra de escala equivale a 1s.

A forma de onda Dm3 foi dividida em dois subtipos diferentes chamados Dm3a e Dm3b (Figuras 5C-F; 7C-F). Ocasionalmente, Dm3 foi precedida por uma curta forma de onda Dm1 (Figuras 5B, 7B), no entanto, a transição entre as duas ondas não foi sempre distinguível ou talvez a onda Dm1 não esteve presente. A forma de onda Dm3a foi classificada como um padrão estereotípico sempre com picos distribuídos aleatoriamente, muitas vezes voltados para baixo, e com certa regularidade (Figuras 5C-E; 7C-E). Dm3a foi gravada em quase todos os percevejos avaliados e em todos os níveis de R_i . O valor de amplitude relativa aumentou à medida que os níveis de R_i diminuíram, por exemplo, em 10^7 Ohms a amplitude foi muito alta (média de 80%), enquanto que em 10^9 Ohms a amplitude foi média (45%). No entanto, a sua frequência foi muito semelhante entre os níveis de R_i aplicados: 3,8 e 3,9 Hz em R_i 10^7 e 10^9 Ohms, respectivamente (Tabela 1).

A forma de onda Dm3b (Figuras 5F, 7F), foi sempre caracterizada como uma forma de onda de curta duração, e sempre intercalada com a forma de onda Dm3a (Figuras 5E, 7E). No entanto, Dm3b muitas vezes não foi claramente distinguida dentro das gravações, ou

talvez nem sempre ocorra. Em ambos os níveis de Ri (10^7 e 10^9 Ohms), Dm3b apresentou um baixo valor de amplitude (11 e 15%, respectivamente) e elevada frequência, com médias de 5,2 e 5,3 Hz, respectivamente (variando de 4,5-5,8 Hz) (Tabela 1).

A onda Dm3a mostrou um grande aumento da amplitude e aparência quando gravado em níveis baixos de Ri (10^8 Ohms e inferior), enquanto que, em níveis elevados de Ri (10^9 Ohms e superior) a amplitude e aparência diminuíram substancialmente (Figuras 9A-D). Estas descobertas suportam que Dm3a apresentou ambos os componentes R e emf, mas foi principalmente dominado por R. Em relação à forma de onda Dm3b, esta foi pouco clara em 10^6 e 10^7 Ohms comparado com níveis mais elevados de Ri, nos quais foi mais claramente visível. Esses resultados indicam que Dm3b foi principalmente dominada pelo componente emf (Tabela 1). Às vezes, ambas as ondas, Dm3a e Dm3b, apresentaram diferenças não só entre os diferentes níveis de Ri aplicados, mas também entre os diferentes insetos e também dentro da gravação do mesmo inseto.

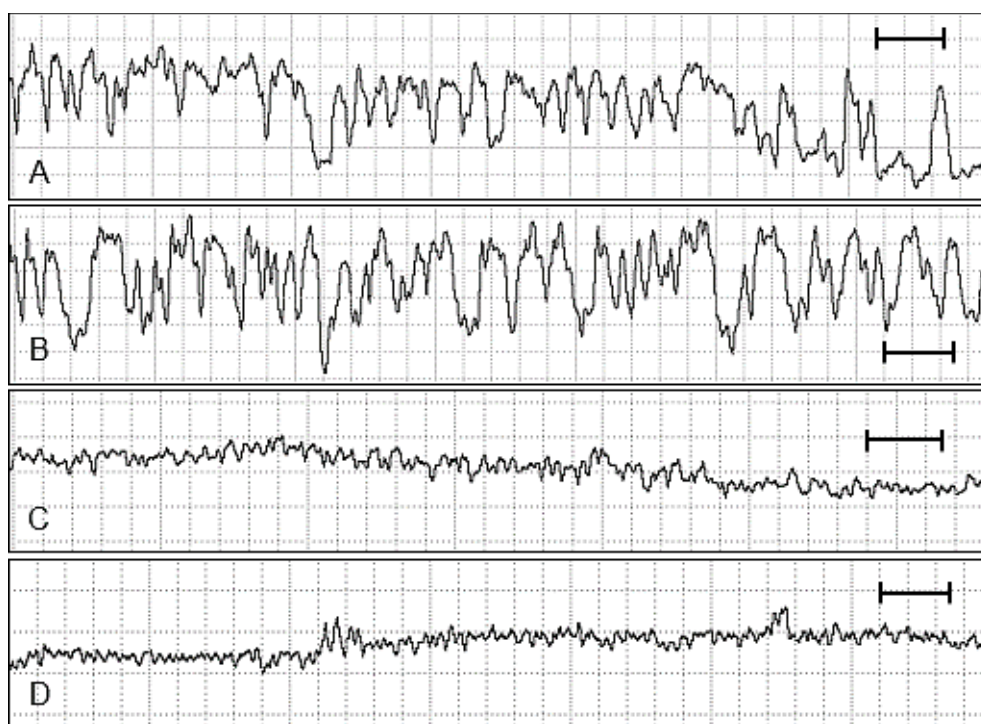
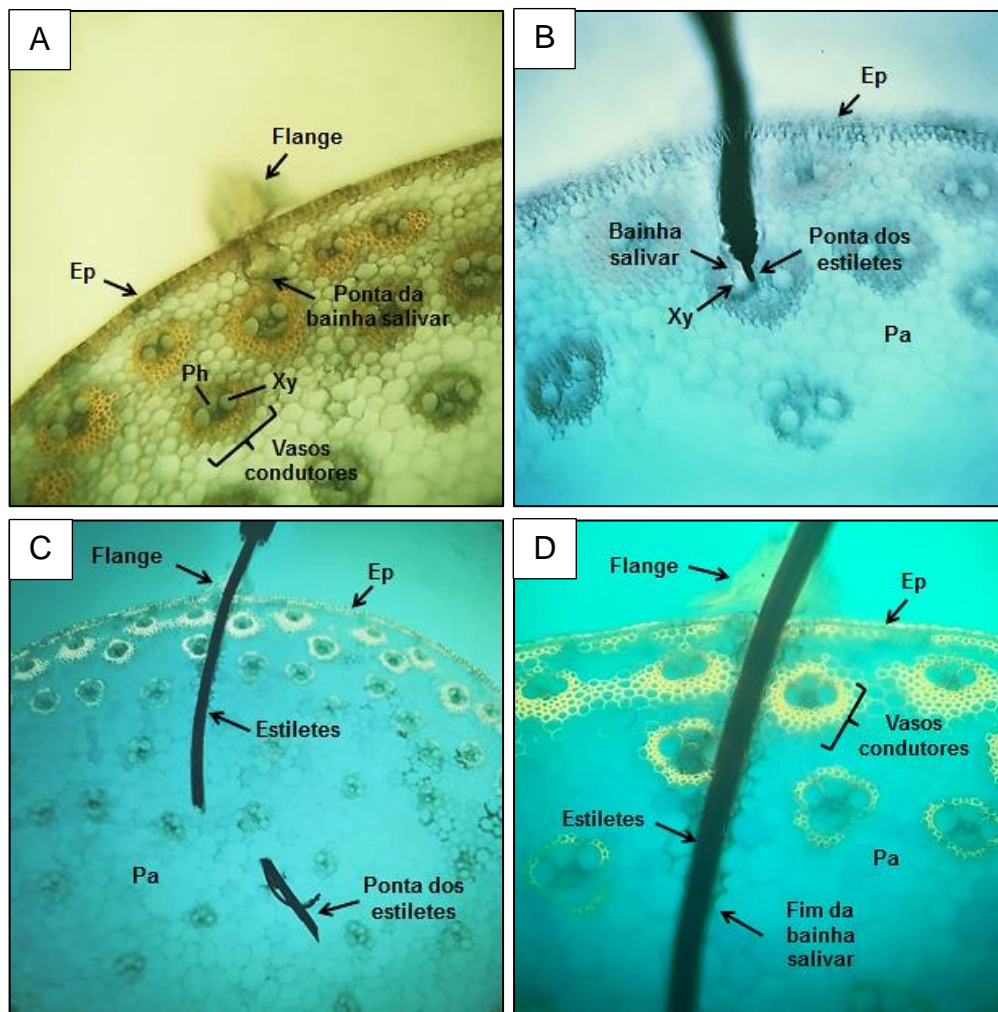


Figura 9 - Forma de onda Dm3a de *Dichelops melacanthus* gravada em colmos de plântulas de milho (estádio V2-V3) em quatro diferentes níveis de impedância de entrada (Ri). A = 10^7 , B = 10^8 , C = 10^9 , D = 10^{10} Ohms. Figuras A-D tem Windaq compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho de 8x. Figuras A-D = barra de escala equivale a 1s.

5.3.2 Correlações entre as formas de onda e sítios específicos de alimentação via análises histológicas

Durante a penetração dos estiletes de *D. melacanthus* no tecido do colmo de milho, foi observada via estudos histológicos, a presença de uma bainha salivar rodeando os estiletes na fase de inserção e penetração dos estiletes. Para a forma de onda Dm1, tanto a ponta dos estiletes quanto a bainha salivar ($n = 7$), foram observadas no tecido do parênquima durante essa forma de onda, revelando que Dm1 representa a inserção e penetração dos estiletes no tecido vegetal e secreção da bainha salivar (Figura 10A). No entanto, duas situações diferentes foram observadas durante a onda Dm1 em relação à secreção da bainha salivar. Durante a forma de onda Dm1 gravada antes da onda Dm2 ($n = 7$), a bainha salivar foi secretada completamente (Figura 10B).



Continua ...

Continuação Figura 10

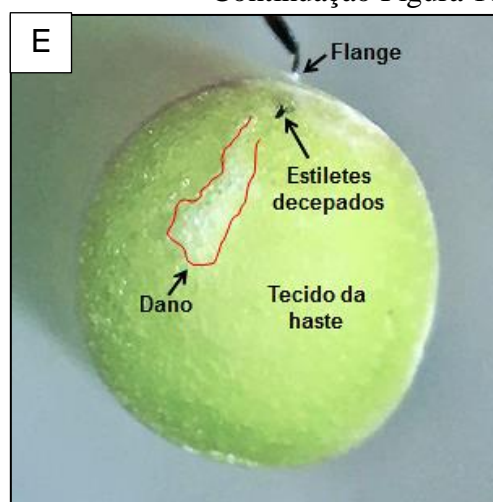


Figura 10 - Cortes histológicos de colmos de plântulas de milho contendo estiletes seccionados e bainhas salivares do percevejo *Dichelops melacanthus*. Bainha salivar terminando no tecido do parênquima durante a forma de onda Dm1 (A). Ponta da bainha salivar e dos estiletes terminando nas células dos vasos do xilema durante a forma de onda Dm2 (B). Ponta dos estiletes em células do parênquima durante a forma de onda Dm3a (C). Secreção da flange (externamente no colmo) e de uma bainha salivar incompleta (internamente no tecido) durante a forma de onda Dm3a (D). Secção de um colmo fresco de milho contendo estiletes seccionados e mostrando a área com dano visível no tecido vegetal (região de coloração esbranquiçada circundada pela linha vermelha) após a gravação de um evento da onda Dm3 (E). Ep = epiderme, Pa = parênquima, Xy = xilema, Ph = floema.

Por outro lado, para a forma de onda Dm1 gravada antes de Dm3a ($n = 7$), a bainha salivar esteve quase sempre presente, mas diferente da anterior, não foi secretada completamente (Figura 10D). Na onda Dm2, todos os cortes histológicos ($n = 7$) mostraram que a ponta da bainha e dos estiletes foram encontradas no interior das células do xilema (Figura 10B). Para a onda Dm3a, a ponta dos estiletes ($n = 7$) estavam sempre posicionadas no tecido do parênquima sem um sítio específico de alimentação ou mesmo uma posição fixa internamente (Figura 10C), como observado na forma de onda de Dm2. Além disso, o corte de colmos frescos de milho, após a gravação da onda Dm3, revelou uma área visualmente danificada no tecido vegetal (região com coloração branca opaca delimitada pela linha vermelha) (Figura 10E).

5.4 Discussão

Nesse trabalho discutimos sete formas de onda diferentes, obtidas com o novo monitor EPG AC-DC utilizando múltiplos níveis de Ri, para criar a segunda biblioteca de formas de onda de um percevejo pentatomídeo, neste caso, *D. melacanthus* ao se alimentar em colmos de plântulas de milho. A construção de bibliotecas de forma de onda tornou-se comum com o advento deste novo monitor, tal como feita por Backus et al. (2013) nos percevejos, *Blissus insularis* Barber e *Blissus occiduus* Barber, por Pearson et al. (2014) com o psílideo *Bactericera cockerelli* (Sulc), e por Lucini et al. (2016) com percevejo *P. guildinii*.

Heterópteros usam, principalmente, duas estratégias de alimentação durante suas atividades alimentares na sua planta hospedeira. A primeira é conhecida como estratégia da bainha salivar, na qual o inseto secreta uma bainha formada por saliva geleificante, que acompanha os estiletos durante toda a sua penetração até alcançar o local preferido de alimentação. A segunda estratégia é conhecida como estratégia de dilaceramento/maceramento, mais recentemente renomeada como estratégia de ruptura celular (BACKUS et al., 2005b). Nessa estratégia, os estiletos movem-se vigorosamente para trás e para a frente no interior do tecido vegetal (ação mecânica) e também secretam saliva aquosa rica em enzimas (ação enzimática) para destruir um aglomerado de células para depois ingerir o conteúdo destruído pelas duas atividades (MILES, 1972; HORI, 2000). Uma mesma espécie de percevejo pode usar apenas uma estratégia, como observado em *E. meditabunda* (LUCINI; PANIZZI, 2016), ou ambas as estratégias como observado em *P. guildinii* (LUCINI et al., 2016) em plantas de soja. No estudo atual, nós mostramos que *D. melacanthus*, também emprega ambas as estratégias de alimentação em plântulas de milho.

Formas de onda não alimentação (Z, Np, e O). Ambas as formas de onda que representam as atividades na qual o inseto está parado ou caminhando sobre a planta são discutidos na literatura (YOUN et al., 2011; LUCINI et al., 2016) e também para *D. melacanthus* a formas de onda Z (repouso) e Np (caminhando) foram facilmente correlacionados com cada comportamento. Além disso, uma nova forma de onda de não alimentação (chamada onda O) foi registrada pela primeira vez em um percevejo, a qual foi visualmente correlacionada com a postura de ovos pela fêmea no colmo do milho. No entanto, esta foi observada apenas uma única vez em Ri de 10^6 Ohms. O tempo médio para completar uma forma de onda O, isto é, o tempo para depositar um ovo foi em média 25 segundos, e o intervalo de tempo entre uma onda O e outra foi ~2 minutos. Uma forma de onda denominado 6, relacionada com a

oviposição, foi observada na cigarrinha do milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (CARPANE et al., 2011), a qual é semelhante em aparência com forma de onda O gravada para *D. melacanthus*.

Formas de onda relacionadas à alimentação. Fase de inserção e penetração dos estiletes (Dm1). Durante esta forma de onda os estiletes são inseridos profundamente dentro do tecido do colmo, além disso, ocorreu a secreção de saliva geleificante para a formação da bainha salivar, a qual foi observada em todas as secções histológicas correlacionados com a onda Dm1. Além disso, muitas vezes foi observada a presença de flanges (deposição de saliva geleificante) externamente sobre o colmo de milho.

Sem dúvida, a forma de onda Dm1 representa a inserção dos estiletes e penetração mais profunda no tecido do colmo em direção ao local de alimentação. Após a inserção, os estiletes são protraídos e retraídos dentro do tecido, até atingir o local, como observado na cigarrinha *Homalodisca coagulata* (Say) (BACKUS et al., 2005a). Na literatura, a fase de inserção e penetração dos estiletes de hemípteros sugadores que utilizam a estratégia da bainha salivar é muito bem discutida, pois é reportado que a secreção de saliva geleificante para criar a bainha salivar ocorre durante essa fase. A secreção da bainha salivar é pensada para ocorrer quando o local preferido de alimentação são os vasos dos tecidos vasculares, ou seja, xilema e floema (como observado por MIRANDA et al., 2009; BONANI et al., 2010; BACKUS et al., 2013; PEARSON et al., 2014; LUCINI; PANIZZU, 2016; LUCINI et al., 2016; SEO et al., 2016).

Durante a gravação foi comum ver algumas flanges criadas pela secreção de saliva geleificante no lado externo do colmo de milho, logo após o percevejo retirar os seus estiletes, o qual provavelmente ocorreu durante a forma de onda Dm1. Em todas as ocorrências que a forma de onda Dm2 (ingestão de seiva dos vasos do xilema, ver mais adiante) foi gravada, a forma de onda Dm1 sempre a precedeu. Portanto, as características elétricas e imagens histológicas nos permitem indicar que durante este momento (onda Dm1), o percevejo secreta a bainha salivar completa enquanto está buscando os vasos do xilema no tecido vegetal.

No entanto, uma situação diferente foi observada em relação a presença da forma de onda Dm1. Ocasionalmente, a onda Dm1 (de curta duração nesse caso) foi gravada antes da forma de onda Dm3, que foi correlacionada com a estratégia de alimentação do tipo ruptura celular (discutido mais tarde). Contudo, durante o comportamento de penetração dos estiletes “*per se*”, é dito que o inseto secreta uma bainha salivar completa, o que acontece quando o local de alimentação são os vasos condutores. Porém, durante o uso da estratégia de ruptura

celular, o inseto também pode criar uma bainha salivar, contudo, não de forma completa (MILES, 1972).

Aqui nós demonstramos e correlacionamos que formas de onda Dm1 curtas, quando registradas antes de Dm3, representam a secreção de uma bainha salivar incompleta, a qual foi correlacionada por meio de cortes histológicos realizados durante a forma de onda Dm3a. É possível ver na imagem a presença de um flange (externamente), e a bainha salivar incompleta internamente no tecido do parênquima circundando os estiletes no início de sua inserção. Como aqui, Lucini et al. (2016) estudando *P. guildinii* alimentando-se de vagens de soja via ruptura celular observaram em imagens histológicas uma leve camada que envolve os estiletes no início de sua inserção no tecido vegetal, e novamente perto do tecido do xilema, a qual foi pensado ser uma bainha salivar.

Formas de onda relacionadas à alimentação. Fase de ingestão (Dm2, Dm3a e Dm3b).

Acreditamos que *D. melacanthus* pode obter seus nutrientes via alimentação nos vasos do xilema e também via ruptura de células do colmo, provavelmente incluindo tecidos vasculares também. No primeiro local de alimentação, o percevejo secreta uma bainha salivar completa, enquanto na segunda, utiliza a estratégia de dilaceramento e de maceramento (chamada de ruptura celular) com a formação de uma bainha salivar incompleta.

A forma de onda Dm2 foi observada em todos os insetos gravados e em todos os níveis de Ri, e também, foi correlacionada com atividades nos vasos do xilema (isto é, a ingestão de líquidos das células do xilema) via estudos histológicos. Além disso, por vezes, a onda Dm2 mostrou uma duração longa, o que é comum ocorrer em insetos sugadores que se alimentam de tecidos vasculares. Por exemplo, *E. meditabunda* alimenta-se mais de uma hora nos vasos do xilema e do floema em hastes de plantas de soja (LUCINI; PANIZZII, 2016).

Dm2 se parece muito com a onda Pg2 de *P. guildinii* (correlacionado com a ingestão de seiva do xilema), em relação à aparência e características elétricas, ambas compartilham algumas semelhanças, como, ondas altamente regulares intercaladas com picos e com uma frequência semelhante (porém os picos foram negativamente orientados em Dm2 e positivamente em Pg2), alto valor de amplitude em Ri 10^9 Ohms, e mistura de origens elétricas para os picos (principalmente R) e onda (principalmente emf). O alto valor de amplitude dessa onda, provavelmente está relacionado com a necessidade do percevejo superar a alta pressão negativa dos vasos do xilema para a absorção do conteúdo celular, o qual é apoiado pelo estudo feito por Dugravot et al. (2008) com uma cigarrinha que se alimenta do xilema. Além disso, Pg2 foi correlacionada via estudos histológicos com

atividades dos estiletes nos vasos do xilema, mais especificamente ingestão de seiva, no folíolo, na haste e em vagens de plantas de soja (LUCINI et al., 2016).

A forma de onda Dm3 foi sempre vista para ocorrer em uma das seguintes sequências de eventos: Dm1 (curta) → Dm3, ou apenas Dm3 (porque às vezes Dm1 não foi claramente separada ou esteve ausente). A forma de onda Dm3 não se assemelha a forma de onda Dm2 e, em raras ocasiões Dm3 ocorreu após Dm2, mas nunca antes da onda Dm2 ou qualquer outra forma de onda relacionada com a ingestão. Observou-se visualmente que *D. melacanthus* moveu seus estiletes continuamente e profundamente no tecido do colmo durante a forma de onda Dm3a, a qual foi correlacionada com as ações de dilaceramento e maceramento, ou seja, estratégia de ruptura celular. Na literatura, foi relatado que os insetos usando esta estratégia de alimentação fazem movimentos vigorosos e contínuos para frente e para trás com seus estiletes no interior do tecido da planta, causando o dilaceramento das células (ação mecânica), e em vez de secretar saliva geleificante, o inseto secreta saliva aquosa rica em enzimas, que causam o maceramento das células (ação enzimática) (MILES, 1972).

Em todas as imagens histológicas feitas durante a forma de onda Dm3a, nenhuma área de dano pode ser distinguida, mas quando cortamos colmos frescos contendo os estiletes decepados, foi possível observar uma região de coloração branca opaca relacionada com as atividades de alimentação feitas durante essa forma de onda. Lucini et al. (2016) também relataram a ocorrência da estratégia de ruptura celular (chamada forma de onda Pg3a) em outro percevejo pentatomídeo, *P. guildinii* alimentando-se de sementes de soja (endosperma). Além disso, os autores também observaram danos visíveis no endosperma das sementes após a gravação desta forma de onda. Além do mais, observou-se em plântulas de milho, que tinham sido submetidas à forma de onda Dm3, a presença de danos visíveis nas folhas após 24 horas da alimentação, se intensificando após 48 horas. As atividades alimentares causaram grandes danos, como a murcha das folhas e eventualmente a sua morte (Figura 11).

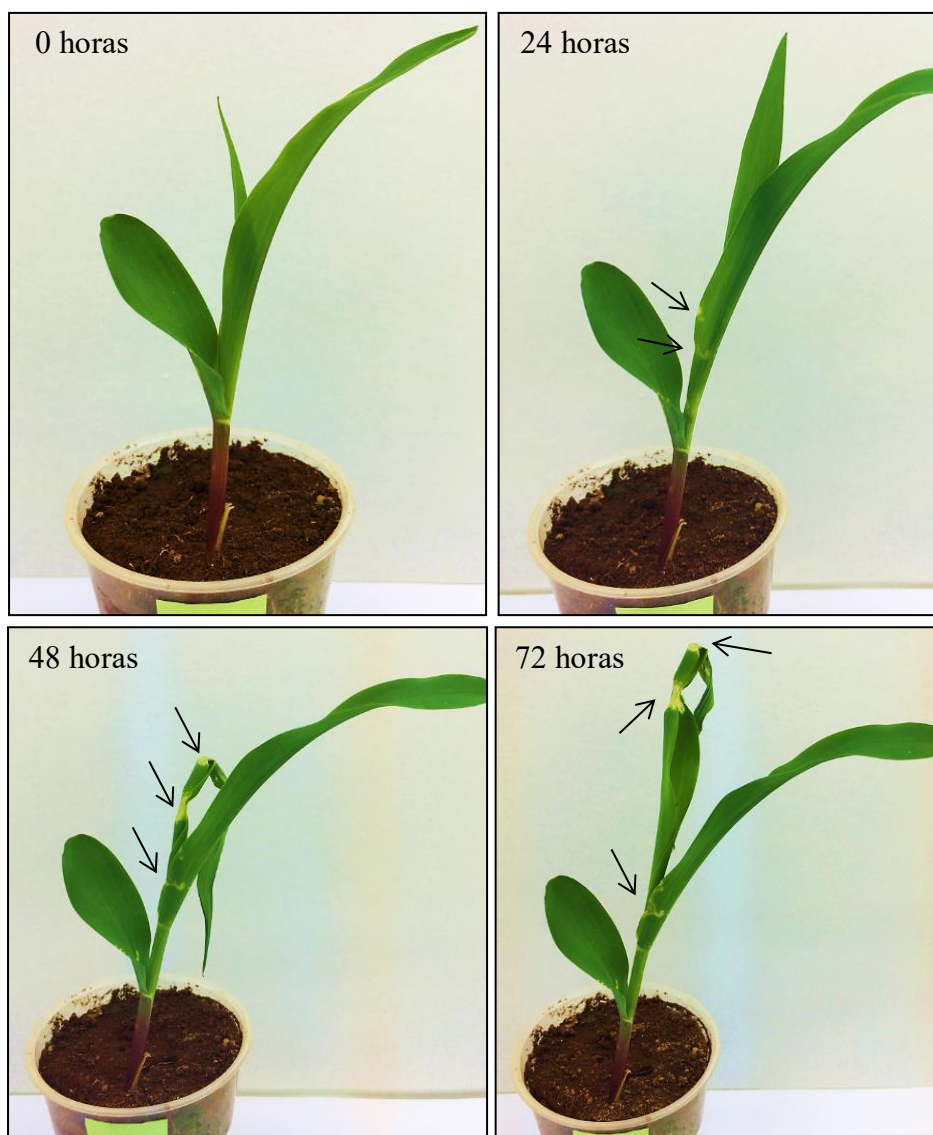


Figura 11 - Progressão dos danos (setas) provocados pelas atividades alimentares de um único percevejo *Dichelops melacanthus* mantido no colmo de plântula de milho (estádio V1) por um período de 8 horas.

No outro subtipo da forma de onda Dm3, denominada Dm3b, foi observado que os estiletes estavam imóveis no interior do tecido do colmo durante um período de tempo muito curto (alguns segundos, muitas vezes), e em seguida, os estiletes moveram-se novamente. Ou seja, Dm3b sempre ocorreu intercalada com a forma de onda Dm3a. Portanto, a forma de onda Dm3b provavelmente representa a ingestão rápida dos fluídos originados pelas atividades de dilaceramento e maceramento. No entanto, esta forma de onda, por vezes, não foi claramente distinguida e /ou registrada em todos os níveis de Ri aplicado. Uma forma de onda semelhante, chamada Pg3b, foi registrada para *P. guildinii* em sementes de soja, na qual os estiletes também permaneceram parados no interior do tecido por um período de tempo

curto e intercalada com momentos em que os estiletes estavam se movendo (onda Pg3a). Mas diferente de *D. melacanthus*, a forma de onda Pg3b foi claramente separada e gravada.

As características elétricas e imagens histológicas indicam que durante a forma de onda Dm3a, ocorre simultaneamente o dilaceramento/maceramento das células do colmo e provavelmente a ingestão do conteúdo celular. Isso se deve a três razões principais: 1) A forma de onda Dm3b, que foi correlacionado com a ingestão, nem sempre foi gravada quando Dm3a estava presente; 2) A secreção de saliva rica em enzimas (maceramento) durante a onda Dm3a, que dissolvem rapidamente o conteúdo celular; e 3) Forma de onda Dm3a apresentou uma mistura de origens elétricas, ou seja, R e emf. Sendo que, a origem R está relacionada com a secreção de grande quantidade de saliva aquosa, que é altamente condutiva, e o componente R é melhor distinguido em baixos níveis de Ri (fato que aconteceu nas gravações). Já o componente emf está relacionada com biopotenciais como ocorre quando o inseto suga os fluídos celulares.

No entanto, esse resultado é diferente do observado em outros insetos que empregam a estratégia de ruptura celular, tais como as cigarrinhas *Empoasca fabae* (Harris), *E. kraemeri* (Ross & Moore) (CALDERON; BACKUS, 1992), *Empoasca vitis* Göthe (JIN et al., 2012), no percevejo *Lygus hesperus* Knight (CLINE; BACKUS, 2002), e para o percevejo pentatomídeo *P. guildinii* (LUCINI et al., 2016). Nos quais, os estiletes também foram observados para se mover rápido e continuamente no interior do tecido, e correlacionados com diferentes atividades dos estiletes. No entanto, as atividades de ingestão são pensadas para não ocorrer neste momento.

Em conclusão, nossos resultados demonstram que *D. melacanthus* alimentando-se de plântulas de milho pode ingerir o conteúdo celular de duas maneiras diferentes: 1) via seiva dos vasos do xilema e 2) ingestão via ação de dilaceramento/maceramento de vários tipos de células. Na primeira, o inseto usa estratégia de bainha salivar a qual é secretada completamente, e no segundo, o percevejo usa a ruptura celular rompendo células do parênquima e provavelmente dos vasos condutores, além disso, há a secreção de uma bainha salivar incompleta. Isso demonstra que *D. melacanthus* pode mudar a sua estratégia de acordo com o local de alimentação explorado, assim como reportado para o percevejo *P. guildinii*.

5.5 Referências

- ALMEIDA, R.; BACKUS, E. A. Stylet penetration behaviours of *Graphocephala atropunctata* (Say): EPG waveforms characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, p. 838-851, 2004.
- ÁVILA, C. J.; PANIZZI, A. R. Occurrence and damage by *Dichelops* (*Neodichelops*) *melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) on corn. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 193-194, 1995.
- BACKUS, E. A.; BENNETT, W. H. The AC-DC Correlation Monitor: new EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing-sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 869-884, 2009.
- BACKUS, E. A.; HABIBI, J.; YAN, F.; ELLERSIECK, M. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implications for transmission of *Xylella fastidiosa*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, p. 787-813, 2005a.
- BACKUS, E. A.; SERRANO, M. S.; RANGER, C. M. Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior and physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 125-151, 2005b.
- BACKUS, E. A.; RANGASAMY, M.; STAMM, M.; MCAUSLANE, H. J.; CHERRY, R. Waveform library for chinch bugs (Hemiptera: Heteroptera: Blissidae): characterization of electrical penetration graph waveforms at multiple input impedances. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, p. 524-539, 2013.
- BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DAGLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, p. 35-49, 2010.
- CALDERON, J. D.; BACKUS, E. A. Comparison of the probing behaviors of *Empoasca fabae* and *E. kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) on resistant and susceptible cultivars of common beans. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 88-99, 1992.
- CARPANE, P.; WAYADANDE, A.; BACKUS, E.; DOLEZAL, W.; FLETCHER, J. Characterization and correlation of new electrical penetration graph waveforms for the corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, p. 515-525, 2011.
- CEN, Y.; YANG, C.; HOLFORD, P.; BEATTIE, G. A. C.; SPOONER-HART, R. N.; LIANG, G.; DENG, X. Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 143, p. 13-22, 2012.

CLINE, A. R.; BACKUS, E. A. Correlations among AC electronic monitoring waveforms, body postures, and stylet penetration behaviors of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). **Environmental Entomology**, v. 31, p. 538-549, 2002.

CHOCOROSQUI, V. R.; PANIZZU, A. R. Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 487-492, 2004.

DUGRAVOT, S.; BACKUS, E. A.; REARDON, B. J.; MILLER, T. A. Correlations of cibarial muscle activities of *Homalodisca* spp, sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) with EPG ingestion waveform and excretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 1467-1478, 2008.

GRAZIA, J. Revisão do gênero *Dichelops* Spinola, 1837 (Heteroptera, Pentatomidae, Pentatomini). **Iheringia Série Zoologia**, v. 53, p. 3-119, 1978.

GREENE, J. K.; TURNIPSEED, S. G.; SULLIVAN, M. J.; MAY, O. L. Treatment thresholds for stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in cotton **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 403-409, 2001.

HORI, K. Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera, pp. 11-36. In: SCHAEFER, C. W.; PANIZZU, A. R. (Eds.). **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton, CRC Press, 856 p, 2000.

JIN, S.; CHEN, Z. M.; BACKUS, E. A.; SUN, X. L.; XIAO, B. Characterization of EPG waveforms for the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), on tea plants and their correlation with stylet activities. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 1235-1244, 2012.

LUCINI, T.; PANIZZU, A. R. Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa mediotabunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring pentatomids for EPG. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, p. 118-132, 2016.

LUCINI, T.; PANIZZU, A. R.; BACKUS, E. A. Characterization of an EPG waveform library for redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), on soybean plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 198-210, 2016.

MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, v. 202, p. 1358-1359, 1964.

MILES, P. W. The saliva of Hemiptera. **Advances in Insect Physiology**, v. 9, p. 183-255, 1972.

MIRANDA, M. P.; FERERES, A.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of *Bucephalogonia xanthophis*, a vector of *Xylella fastidiosa* in citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 35-46, 2009.

PANIZZZI, A. R. Growing problems with stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): species invasive to the U.S. and potential Neotropical invaders. **American Entomologist**, v. 61, p. 223-233, 2015.

PEARSON, C. C.; BACKUS, E. A.; SHUGART, H. J.; MUNYANEZA, J. E. Characterization and correlation of EPG waveforms of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae): Variability in waveform appearance in relation to applied signal. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, p. 650-666, 2014.

PRADO, E.; TJALLINGII, W. F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 72, p. 157-165, 1994.

RITCHIE, S.; HANWAY, J. J. **How a maize plant develops**. Iowa, Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, Ames (Special Report n. 48), 1989.

SEO, B. Y.; JUNG, J. K.; PARK, C. G.; LEE, S. G.; PARK, Y. L. Plant penetration activities by the flatid planthopper *Metcalfa pruinosa* (Hemiptera: Fulgoroidea): an electrical penetration graph-histology analysis. **Journal of Applied Entomology**, v. 140, p. 706-714, 2016.

TJALLINGII, W. F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, p. 721-730, 1978.

TJALLINGII, W. F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 177-186, 1985.

WALKER, G. P. A beginner's guide to electronic monitoring of homopteran probing behavior, pp. 14-40. In: WALKER, G. P.; BACKUS, E. A. (Eds.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. Entomological Society of America, Lanham, Academic Press, 260 p, 2000.

YOUN, Y.; BACKUS, E. A.; SERIKAWA, R. H.; STELINSKI, L. L. Correlation of an electrical penetration graph waveform with walking by Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 94, p. 1084-1087, 2011.

CAPÍTULO VI

Atividades alimentares do percevejo barriga verde *Dichelops furcatus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) caracterizadas por meio do monitoramento eletrônico (EPG) e análises histológicas

6.1 Introdução

Dichelops furcatus (F.), comumente chamado percevejo barriga-verde, é uma espécie neotropical com ocorrência em diferentes países da América do Sul. No Brasil ele é reportado com maior frequência na Região Sul (CHIARADIA et al., 2011). Este percevejo tem sido relatado na literatura para se alimentar em inúmeras espécies de plantas, incluindo plantas cultivadas e não cultivadas (SMANIOTTO; PANIZZI, 2015). Entre as plantas cultivadas, esse percevejo é reportado como praga da soja, *Glycine max* (L.) Merrill, desde os anos 70 (PANIZZI et al., 1977).

Mais recentemente, *D. furcatus* foi encontrado se alimentando em cabeças de girassol, *Helianthus annuus* L. (FROTA; SANTOS, 2007), em milho, *Zea mays* (L.) (ROZAGOMES et al., 2011), no qual causa danos semelhantes aos causados por outra espécie de percevejo barriga verde, *Dichelops melacanthus* (Dallas) (ÁVILA; PANIZZI, 1995; CHOCOROSQUI; PANIZZI, 2004). Em trigo, *Triticum aestivum* L., *D. furcatus* foi relatado para se alimentar e causar danos nessa cultura na Região Sul do Brasil (CHOCOROSQUI; PANIZZI, 2004; PEREIRA et al., 2013), onde nos últimos anos tem-se observado um grande aumento da sua ocorrência. Um outro pentatomídeo, *Thyanta perditor* (F.), também é observado atacando a cultura do trigo nas regiões produtoras do Brasil (FERREIRA; SILVEIRA, 1991). Por outro lado, em regiões tritícolas dos Estados Unidos (desde a Geórgia até Minnesota), várias outras espécies de pentatomídeos tem sido observado na cultura de trigo, com destaque para o complexo de *Euschistus* spp. [principalmente *Euschistus servus* (Say), *Euschistus variolarius* (Palisot de Beavois), e *Euschistus ictericus* (L.)], e *Oebalus pugnax* (F.) (BUNTIN; GREENE, 2004; KOCH et al., 2016).

D. furcatus alimenta-se em ambos os estádios de desenvolvimento da planta, vegetativo e reprodutivo, causando danos significativos (PANIZZI et al., 2016). Por causa do aumento recente de sua ocorrência em áreas com plantio de trigo e a falta de informações na literatura sobre o seu comportamento alimentar, mais estudos são necessários para entender

essas atividades em diferentes fases de desenvolvimento do trigo. Para fazê-lo, há uma técnica conhecida como EPG (*Electrical Penetration Graph*) em que um inseto picador-sugador e uma planta fazem parte de um circuito elétrico simples, onde um baixo fluxo de corrente elétrica circula pelo circuito.

As atividades alimentares e não-alimentares são capturadas pelo sistema EPG e são apresentadas na tela do computador na forma de ondas elétricas (TJALLINGII, 1978, 1985; WALKER, 2000). Os pulgões são os insetos sugadores mais estudados usando a técnica de EPG. Por outro lado, em percevejos pentatomídeos, essa técnica também tem sido utilizada para avaliar o comportamento alimentar, mas por enquanto poucas espécies tiveram suas atividades alimentares caracterizadas. Sendo essas, *Edessa meditabunda* (F.) e *Piezodorus guildinii* (Westwood) em soja (LUCINI; PANIZZII, 2016; LUCINI et al., 2016, respectivamente), e *D. melacanthus* em plântulas de milho (LUCINI; PANIZZII, 2017).

Portanto, o presente estudo visou caracterizar o comportamento alimentar de *D. furcatus* em plantas de trigo. Os objetivos foram: 1) criar uma biblioteca de formas de onda para caracterizar todas as ondas de EPG produzidas pelo percevejo *D. furcatus* alimentando-se de plantas de trigo durante o período vegetativo e reprodutivo, 2) determinar os significados biológicos de cada forma de onda registrada via características elétricas e estudos histológicos, bem como, determinar os locais de alimentação explorados pelo percevejo.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Colônia de percevejos e obtenção das plantas de trigo

Adultos de *D. furcatus* foram coletados a campo na área experimental da Embrapa Trigo localizada em Passo Fundo, RS, Brasil (28°15'S, 52°24'W). Os percevejos foram coletados em plantas de trigo e levados para o laboratório de entomologia e colocados em gaiolas de criação (25 x 20 x 20 cm), forradas com papel filtro para iniciar e manter as colônias. As gaiolas foram mantidas em sala de criação à 25 ± 1°C, 65 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (luz : escuro).

Uma fonte de alimento padrão foi fornecida aos percevejos, composta por vagens de feijão verde (*Phaseolus vulgaris* L.), amendoim cru sem casca (*Arachis hypogaea* L.), sementes maduras de soja e plântulas de trigo, a qual foi substituída duas vezes por semana. Durante este momento, os ovos foram recolhidos e colocados no interior de caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) para criar as ninfas e obter os adultos para serem utilizados nos experimentos.

Sementes de trigo cv. BRS Parrudo foram semeadas semanalmente em pequenos copos plásticos (100 ml) e em vasos maiores (2L) e mantidos em casa de vegetação (Figuras 1A, B). Plantas no estágio 3 (V3 - perfilhamento) cultivadas nos copos e plantas no estágio 11.1 (R11.1 - fase de grão leitoso) (LARGE, 1954) cultivadas nos vasos maiores, foram separadas e utilizadas nas gravações de EPG durante as fases vegetativa e reprodutiva, respectivamente.



Figura 1 - Plantio escalonado de trigo em copos plásticos descartáveis (100 ml) (A) e em vasos plásticos (2L) (B) mantidos em casa de vegetação.

6.2.2 Gravações de EPG e obtenção dos dados

O comportamento alimentar de *D. furcatus* em plantas de trigo foi monitorado usando um monitor AC-DC de quatro canais (BACKUS; BENNETT, 2009; EPG Technologies, Inc., Gainesville, FL, EUA). Antes de iniciar as gravações do EPG, fêmeas adultas foram retiradas da colônia estabelecida em laboratório, colocadas em um gerbox forrado com papel filtro e sem alimento por cerca de 15 horas (período de jejum) antes da fixação do fio de ouro. Em seguida, os percevejos foram ligados ao fio de ouro seguindo a metodologia utilizada por Lucini e Panizzi (2016).

Após este processo, cada percevejo foi conectado individualmente em um dos amplificadores do EPG (canal) e posicionado no colmo da planta de trigo durante o período vegetativo (Figura 2A) e na espiga durante o período reprodutivo (Figura 2B). Para fechar o circuito elétrico, o elétrodo da planta (± 3 cm de comprimento) foi inserido no solo contendo a planta. Insetos, plantas, e os quatro amplificadores de EPG foram mantidos dentro de uma gaiola de Faraday. No período vegetativo, a plântula de trigo foi mantida com seu colmo posicionado verticalmente (Figura 2A), enquanto que, no período reprodutivo, a espiga de trigo foi deitada sobre uma placa plástica (11 x 11 cm) e mantida horizontalmente usando tiras de *Parafilm* (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI). A placa de plástico foi mantida horizontalmente por uma presilha a qual estava presa a um suporte de metal (Figura 2B).

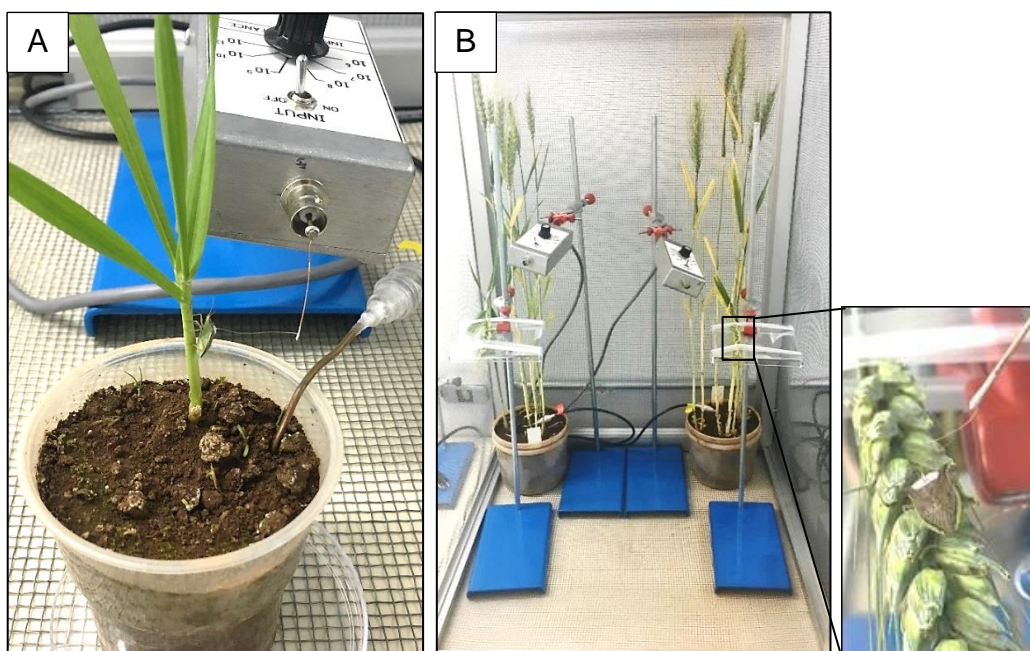


Figura 2 - Fêmeas adultas de *Dichelops furcatus* presas no fio de ouro durante a gravação de seu comportamento alimentar em estrutura vegetativa de trigo: colmo (estádio V3 - perfilhamento) (A) e em estrutura reprodutiva: espiga de trigo (estádio R11.1 - fase de grão leitoso) (B).

Alterações nos componentes elétricos, isto é, resistência (R) e a força eletromotriz (emf), foram amplificadas, retificadas, e digitalizadas a uma taxa de amostragem de 100 Hz por canal utilizando um DI-710 (DATAQ Instruments, Akron, OH) e gravado usando um notebook HP Pentium com software Windaq Lite (DATAQ) instalado. O controlador (retificador) para manter a onda nativa após ajustes de retificação e de ganho foram ajustados para a ótima visualização das formas de onda de acordo com Backus e Bennett (2009).

Para caracterizar as formas de onda, foram consideradas as seguintes características elétricas: componentes de frequência, amplitude, e de origem elétrica, ou seja, R e emf. Além disso, fizemos uso de análises histológicas para correlacionar as formas de onda com os locais de alimentação, e nos baseamos em trabalhos publicados na literatura com EPG em pentatomídeos desenvolvidos por Lucini e Panizzi (2016, 2017) e Lucini et al. (2016).

No experimento, foram aplicados dois níveis diferentes de impedância de entrada (R_i), 10^7 e 10^9 Ohms, e um nível de voltagem de 50 mV aplicando corrente alternada (AC). Ao todo 40 percevejos (20 em cada nível de R_i) foram registrados com êxito durante o período vegetativo e mais 40 (20 em cada R_i) durante o período reprodutivo. Os percevejos foram monitorados sem perturbação por um período de 8 h, em uma sala fechada com condições controladas (25 ± 2 ° C) e luz contínua.

6.2.3 Análise histológica para determinar a posição dos estiletes e/ou da bainha salivar no tecido vegetal

Estudos histológicos foram feitos para determinar a posição da ponta dos estiletes e/ou da bainha salivar de *D. furcatus* em colmo e semente de trigo, o que nos permitiu correlacionar cada sítio alimentar com as diferentes formas de onda observados durante as gravações de EPG. Para isso, um conjunto de fêmeas adultas de *D. furcatus* foi gravado em R_i 10^7 Ohms e 50 mV de sinal AC. O monitor EPG foi desligado cada vez que se observou uma forma de onda de interesse na tela do computador, e em seguida, os estiletes foram cuidadosamente cortados usando um micro tesoura entomológica. Na sequência, o tecido vegetal, contendo os estiletes seccionados, foi processado para preparar as lâminas semi-permanentes de acordo com a metodologia aplicado por Lucini e Panizzi (2016).

Para fazer as análises histológicas nós usamos plantas de trigo mais desenvolvidas, no estágio 8 (V8 - folha bandeira visível) (LARGE, 1954), isso devido o colmo ser mais rígida o que permitiu fazer bons cortes histológicos (o comportamento e as formas de onda observadas tanto em plantas mais novas quando em mais velhas foram similares). As posições da ponta dos estiletes e/ou da bainha salivar no colmo e na semente de trigo, foram determinados com base em 10 espécimes para a forma de onda Df1a, 12 espécimes para Df2, 11 espécimes para Df3a e 10 espécimes para Df4a. As imagens digitais foram capturadas, utilizando um microscópio Olympus BX50 (Shinjuku, Tokyo, Japão) acoplado a uma câmera de vídeo Sony DXC 107A (Minato, Tokyo, Japan), ligado a um computador.

6.3 Resultados

6.3.1 Caracterização das formas de onda

Visão geral das formas de onda geradas para *Dichelops furcatus* em plantas de trigo.

Durante as atividades alimentares de *D. furcatus* em plantas de trigo nos períodos vegetativos e reprodutivos, foram gravadas nove diferentes formas de onda, as quais representaram as fases de não alimentação e de alimentação. Em relação à nomenclatura, os tipos de ondas referentes a atividades alimentares foram indicados como Df (*Dichelops furcatus*) mais um número e os subtipos por uma letra minúscula adicional, tal como aplicado em outras pentatomídeos (LUCINI; PANIZZ, 2016, 2017; LUCINI et al., 2016).

Duas dessas formas de onda representaram as atividades de não alimentação, nomeadas: Np e Z, enquanto que as atividades de alimentação foram representadas por outras quatro formas de onda, nomeadas: Df1, Df2, Df3 e Df4. Com exceção da forma de onda Df2, todas as demais foram divididas em dois subtipos como segue, Df1a e Df1b, Df3a e Df3b e Df4a e Df4b, respectivamente. As ondas alimentares foram agrupadas em duas famílias diferentes: inserção e penetração dos estiletes (P) e ingestão (I). A família P consistiu de duas formas de onda (Df1a e Df1b), e a família I consistiu de cinco formas de onda (Df2, Df3a, Df3b, Df4a e Df4b). Devido as formas de onda gravadas em ambas as estruturas vegetais avaliadas (colmo e espiga) apresentarem características similares, elas foram agrupadas em uma mesma tabela (Tabela 1).

Formas de onda de não alimentação. Duas formas de onda de não alimentação foram gravadas para o percevejo *D. furcatus*, nomeadas Z e Np (Figura 3A), as quais foram separadas em função de suas características elétricas e também foram visualmente correlacionadas com seus significados biológicos.

Formas de onda Z e Np: a onda Z ocorreu quando o percevejo estava parado sobre a superfície da planta, e diferente da onda Np, a onda Z foi caracterizada por uma baixa amplitude sem variação na sua aparência nos diferentes níveis de Ri, portanto essa representa a linha de base da gravação. A onda Np foi observada quando o percevejo estava se movimentando sobre a planta e foi caracterizada por picos irregularmente distribuídos e com amplitude variável de acordo com o nível de Ri aplicado. Os resultados obtidos sugerem que a onda Np apresenta um forte componente emf, embora o componente R também esteja presente (Tabela 1).

Tabela 1 - Sumário das formas de onda EPG AC-DC, suas principais características elétricas, e atividades biológicas propostas para cada forma de onda gravada durante o comportamento alimentar de *Dichelops furcatus* em colmos de plântulas de trigo e espigas de trigo.

Fase	Família	Tipo ou subtipo	Estrutura da planta	Amplitude relativa (%)		Frequência (Hz)		Origem elétrica	Atividade biológica proposta
				Ri 10 ⁷	Ri 10 ⁹	Ri 10 ⁷	Ri 10 ⁹		
Não alimentação	-	Np	Colmo/espiga	Baixo-médio	Médio-alto	Irregular	Irregular	Principalmente emf/algum R	Caminhando sobre a superfície da planta
	-	Z	Colmo/espiga	Muito baixo	Muito baixo	-	-	-	Parado na superfície da planta
Inserção e penetração dos estiletes	P	Df1a	Colmo/espiga	100	100	Irregular	Irregular	Principalmente R	Inserção e penetração profunda dos estiletes no tecido vegetal e secreção da bainha salivar
	P	Df1b	Espiga	35 (16-100)	23 (13-37)	5,1 Hz (4,2-5,7)	4,7 Hz (3,8-5,8)	Principalmente R	Percevejo encontrou uma camada de célula rígida requerendo a protração e retração dos estiletes
Ingestão	I	Df2	Colmo/espiga	28 (11-53)	60 (29-100)	3,1 Hz (2,6-3,9)	3,1 Hz (2,4-4,2)	Mistura; pico = R/emf; onda = emf	Ingestão de seiva do xilema

Continua ...

Fase	Família	Tipo ou subtipo	Estrutura da planta	Amplitude relativa (%)		Frequência (Hz)		Origem elétrica	Atividade biológica proposta
				Ri 10 ⁷	Ri 10 ⁹	Ri 10 ⁷	Ri 10 ⁹		
Salivação/ Ingestão	I	Df3a	Colmo	57 (37-90)	31 (19-52)	3,1 Hz (2,8-3,5)	3,0 Hz (2,9-3,2)	Principalmente R; algum emf	Dilaceramento mecânico e maceramento enzimático das células do colmo, e provavelmente ingestão
Ingestão	I	Df3b	Colmo	15 (7-19)	19 (15-22)	3,9 Hz (3,5-4,2)	4,1 Hz (4,0-4,2)	Principalmente emf	Ingestão do conteúdo celular do colmo de trigo previamente dilacerado/macerado
Salivação/ ingestão	I	Df4a	Espiga	51 (32-79)	35 (18-55)	Irregular + secções regulares 3,5 Hz	Irregular + secções regulares 3,8 Hz	Principalmente R; algum emf	Dilaceramento mecânico e maceramento enzimático das células do endosperma da semente de trigo
Ingestão	I	Df4b	Espiga	20 (9-34)	27 (11-65)	3,5 Hz (2,7-4,7)	4,0 Hz (3,0-5,1)	Principalmente emf	Ingestão do conteúdo celular do endosperma da semente previamente dilacerado/macerado

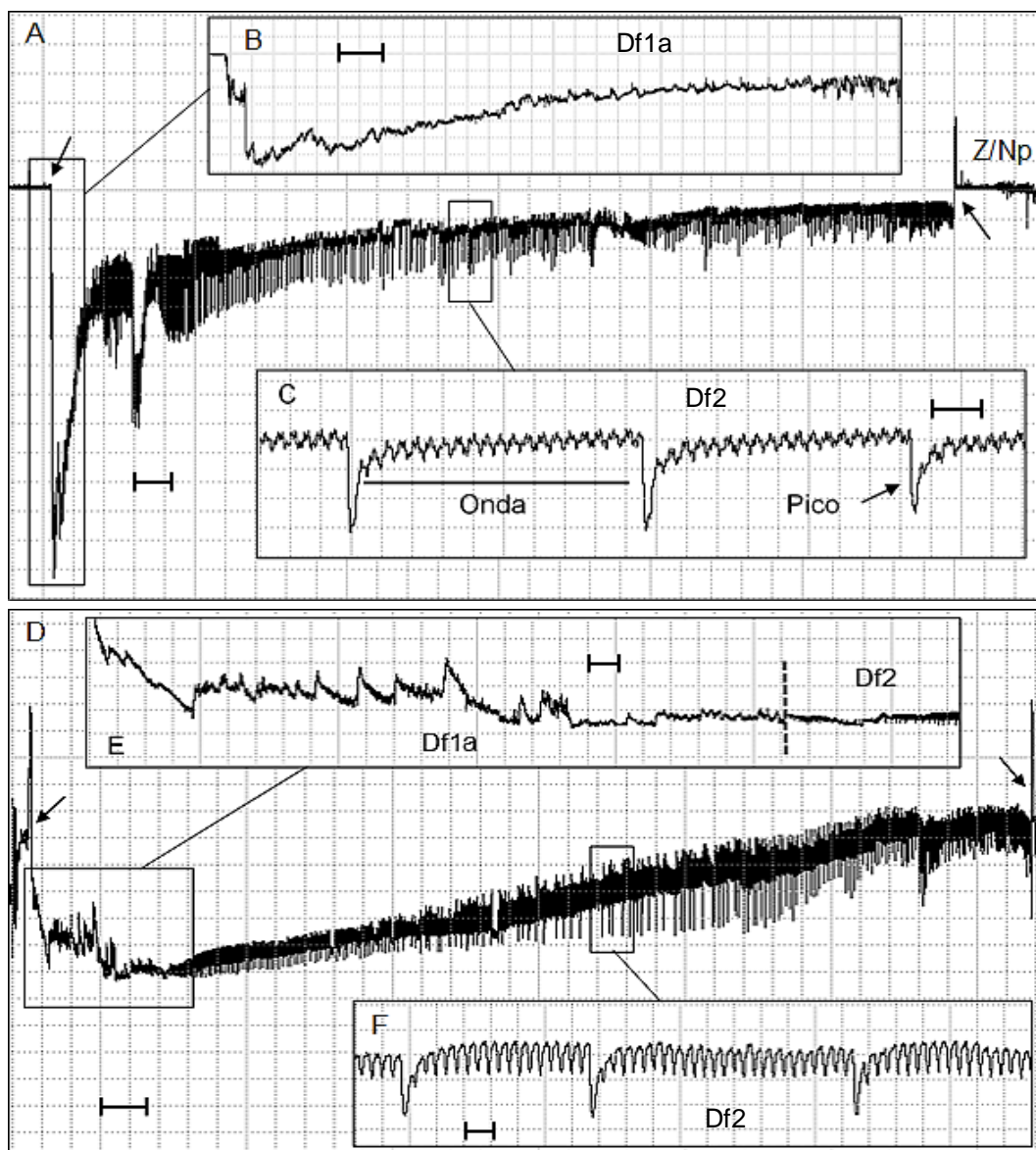


Figura 3 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em colmo de plântulas de trigo durante o período vegetativo (estádio V3 - perfilhamento) aplicando um Ri de 10^7 Ohms (A-C) e 10^9 Ohms (D-F). Visualização comprimida de um evento alimentar (~40 min) mostrando as formas de onda Df1a (inserção e penetração dos estiletes) e Df2 (ingestão de seiva do xilema) (A). Visualização expandida da forma de onda Df1a (B). Visualização expandida da forma de onda Df2 e definição da porção dos picos e das ondas (C). Visualização comprimida de um evento de alimentação (~35 min) mostrando as formas de onda Df1a e Df2 (D). Visualização expandida da forma de onda Df1a e início da onda Df2 (E). Visualização expandida da forma de onda Df2 (F). Figura A tem Windaq compressão 400 [80 s/divisão vertical], ganho de 16x. B tem compressão 25 [5 s/divisão vertical], ganho de 8x. C tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 32x. D tem compressão 300 [60 s/divisão vertical], ganho de 8x. E tem compressão 50 [10 s/divisão vertical], ganho de 8x. F tem compressão 5 [1 s/divisão vertical], ganho de 8x. Setas indicam o início ou o fim de um evento alimentar. Figuras A, D = barra de escala equivale a 100s, figuras B, E = barra de escala equivale a 10s, figuras C, F = barra de escala equivale a 1s.

Formas de onda de alimentação. Duas principais famílias de formas de onda (P e I) foram descritas durante a alimentação de *D. furcatus* no colmo e espiga de trigo, e foram compostas por sete diferentes tipos/subtipos de ondas, nomeadas: Df1a, Df1b, Df2, Df3a, Df3b, Df4a e Df4b. Estas serão descritas na ordem em que ocorrem durante as atividades de alimentação de *D. furcatus*.

Fase de inserção e penetração dos estiletes. Família P (Df1a e Df1b). Df1 ocorreu após qualquer onda de não alimentação, Z ou Np, e foi dividida em dois subtipos: Df1a e Df1b. O primeiro subtipo foi registrada em ambas as estruturas vegetais avaliadas (colmo e espiga) sendo caracterizada por picos irregulares sem um padrão claro (Figuras 3B, E; 4A-C), e quase sempre apresentou a mais elevada amplitude entre todas as formas de onda registradas em cada evento alimentar. O subtipo Df1b foi registrada apenas em gravações na espiga de trigo, e foi caracterizada por um padrão de onda estereotípico (Figuras 4A-C) (as vezes com picos aleatórios) de baixa a média amplitude (35 e 23% em 10^7 e 10^9 Ohms, respectivamente), e uma frequência alta e regular variando de 4,7 a 5,1 Hz entre os níveis de impedância (Tabela 1). O subtipo Df1b sempre ocorreu após Df1a ou também entre eventos desse subtipo (ex. Df1a → Df1b → Df1a) (Figuras 4B, C). Em geral, ambos os subtipos foram mais claramente distinguidos em 10^7 Ohms (nível baixo de Ri) do que em 10^9 Ohms (nível alto de Ri). Portanto, apresentaram R como principal componente (Tabela 1).

Df1a sempre precedeu a forma de onda Df2 (atividades no xilema) (Figura 3E) gravada no colmo, e também foi muitas vezes observado antes da onda Df3a (atividades de ruptura celular no colmo) (Figuras 5B, 6B). Por sua vez, na espiga, as ondas Df2 e Df4a (ruptura celular na espiga) foram precedidas por ambos os subtipos de Df1. No colmo e na espiga, as ondas Df1 (ambos os subtipos) e Df2 foram facilmente distinguidas uma da outra durante a gravação e também entre ambos os níveis de Ri (Figuras 3E, 4A). Enquanto que Df1 (ambos os subtipos) e Df3a no colmo e Df4a na espiga, nem sempre foram claramente distinguidas uma da outra, principalmente quando gravadas em 10^9 Ohms (Figura 6B).

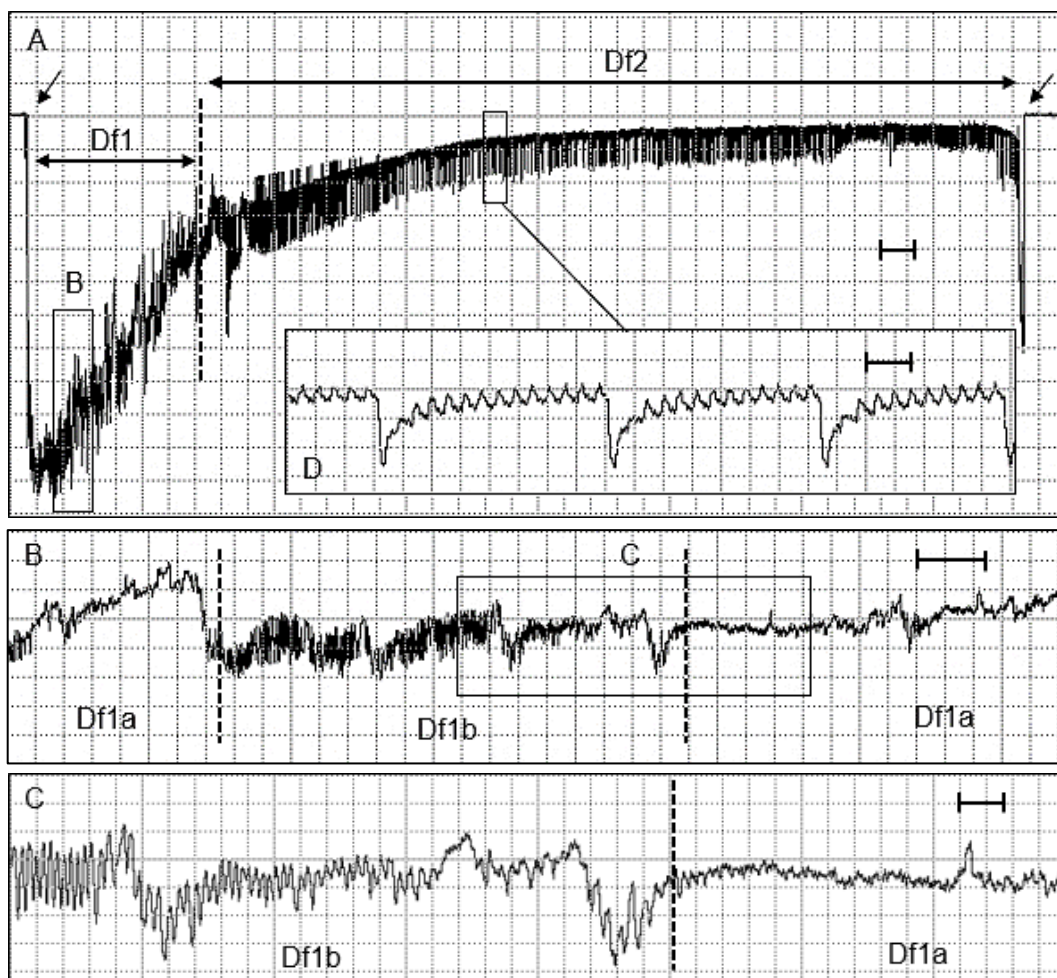


Figura 4 - Formas de onda gravadas usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em espigas de trigo durante o período reprodutivo (estádio R11.1 – grão leitoso) aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Visualização comprimida de um evento alimentar (~50 min) mostrando as formas de onda Df1 (inserção e penetração dos estiletes) e Df2 (ingestão de seiva do xilema) (A). Visualização expandida de ambos os subtipos da forma de onda Df1 - Df1a e Df1b (B). Detalhe dos subtipos Df1a e Df1b (C). Visualização expandida da forma de onda Df2 (D). Figura A tem Windaq compressão 400 [80 s/divisão vertical], ganho de 8x. B tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 8x. C tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 16x. D tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 16x. Setas indicam o início ou o fim de um evento alimentar. Figura A = barra de escala equivale a 100s, figura B = barra de escala equivale a 5s, figuras C, D = barra de escala equivale a 1s.

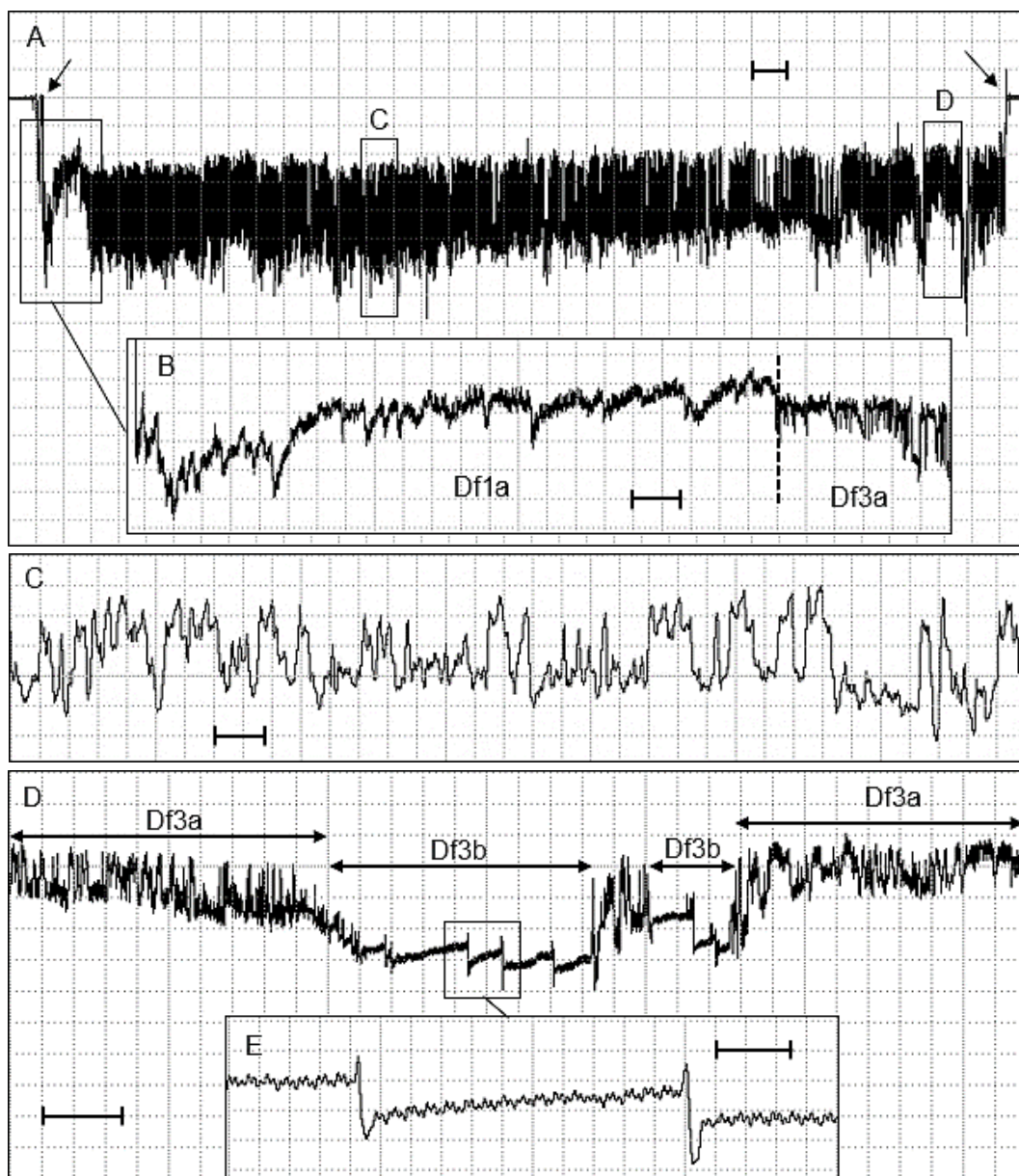


Figura 5 - Forma de onda Df3 gravada usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em colmo de plântula de trigo durante o período vegetativo (estádio V3 - perfilhamento) aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Visualização comprimida de um evento alimentar (~60 min) mostrando as ondas Df1a (inserção e penetração dos estiletes) e Df3 (atividades de dilaceramento/ maceramento e ingestão) (A). Visualização expandida da forma de onda Df1a e início da forma de onda Df3a (B). Visualização expandida da forma de onda Df3a (C). Detalhe das formas de onda Df3a e Df3b (D). Visualização expandida da forma de onda Df3b (E). Figura A tem Windaq compressão 500 [100 s/divisão vertical], ganho de 16x. B tem compressão 30 [6 s/divisão vertical], ganho de 16x. C tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 16x. D tem compressão 20 [4 s/divisão vertical], ganho de 8x. E tem compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho de 16x. Setas indicam o início ou o fim de um evento alimentar. Figura A = barra de escala equivale a 100s, figuras B, D = barra de escala equivale a 10s, figuras C, E = barra de escala equivale a 1s.

Fase de ingestão. Família I (Df2, Df3a, Df3b, Df4a e Df4b). A família I englobou cinco diferentes formas de onda, nomeadas Df2, Df3a, Df3b, Df4a e Df4b. Df2 foi sempre gravada imediatamente após a forma de onda Df1 tanto em colmo (Figura 3E) quanto na espiga de trigo (Figura 4A). Em ambas as estruturas vegetais, Df2 foi composta por porções de ondas repetitivas e intercaladas com picos, em geral, negativamente orientados, os quais aconteceram em intervalos regulares (Figuras 3A, C, D, F; 4A, D – picos e ondas são definidos na Figura 3C).

Em ambos os níveis de Ri (10^7 e 10^9 Ohms) e também entre as estruturas vegetais avaliadas (colmo e espiga) a aparência da onda Df2 e a orientação dos picos foram similares, exceto os valores de amplitude que variaram grandemente entre os níveis de Ri aplicado, porém, não entre as estruturas vegetais. Em relação aos valores de frequência, Df2 apresentou um padrão regular com média de 3,1 Hz em ambos níveis de impedância, por outro lado, o valor de amplitude foi muito menor quando aplicado 10^7 Ohms (28%) comparado com 10^9 Ohms (60%) (Tabela 1). A onda Df2 apresentou uma mistura de componentes elétricos, na qual os picos apresentaram o componente R, pois foram mais claramente distinguidos em 10^7 Ohms, mas também apresentaram o componente emf, pois ainda foram claramente visíveis e separados da porção das ondas em alto nível de Ri (10^9 Ohms). Por outro lado, a porção das ondas, foi mais enfatizada em 10^9 Ohms, portanto, as ondas foram dominadas pelo componente emf (comparação entre as Figuras 3C e 3F).

Dois subtipos foram gravados para a forma de onda Df3 - Df3a e Df3b (Figuras 5A-E, 6A-F), sendo essas gravadas apenas quando o percevejo se alimentou no colmo de trigo. Df3a foi frequentemente gravada após uma curta forma de onda Df1a (Figuras 5B, 6B), entretanto, a separação entre elas, às vezes, não foi claramente possível. Df3a foi caracterizada por um padrão estereotípico com certa regularidade e picos frequentemente orientados negativamente (Figuras 5C, 6C). Entretanto, foi muito variável em aparência não apenas entre os níveis de Ri aplicados, mas também entre os percevejos e até mesmo dentro da gravação do mesmo inseto. Mesmo sob estas circunstâncias, Df3a apresentou uma frequência similar em ambos os níveis de Ri (médias de 3,1 e 3,0 Hz em 10^7 e 10^9 Ohms, respectivamente). Entretanto, os valores de amplitude apresentaram grandes diferenças, em que o aumento do nível de Ri diminuiu o valor da amplitude (57% em 10^7 Ohms e 31% em 10^9 Ohms) (Tabela 1).

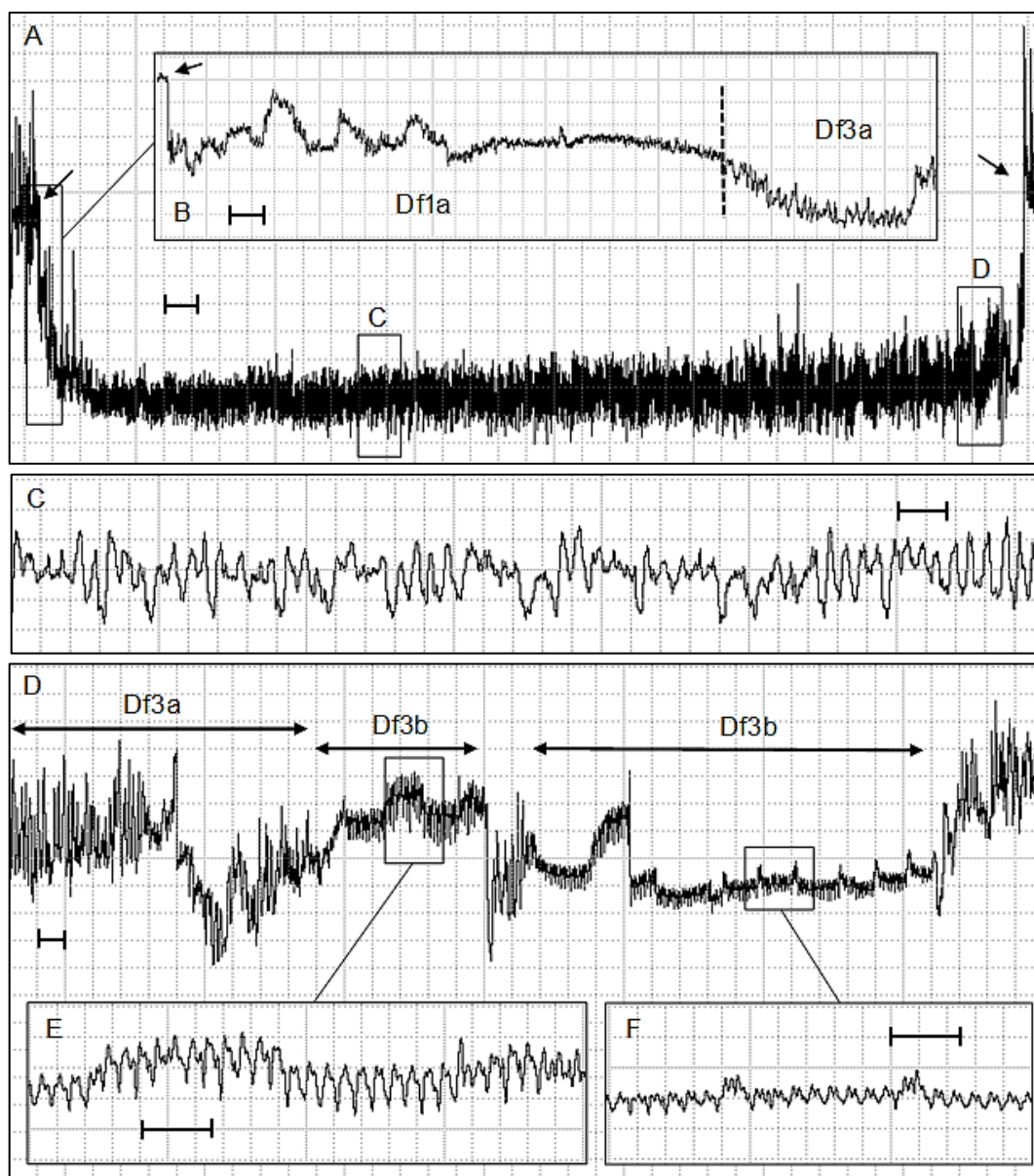
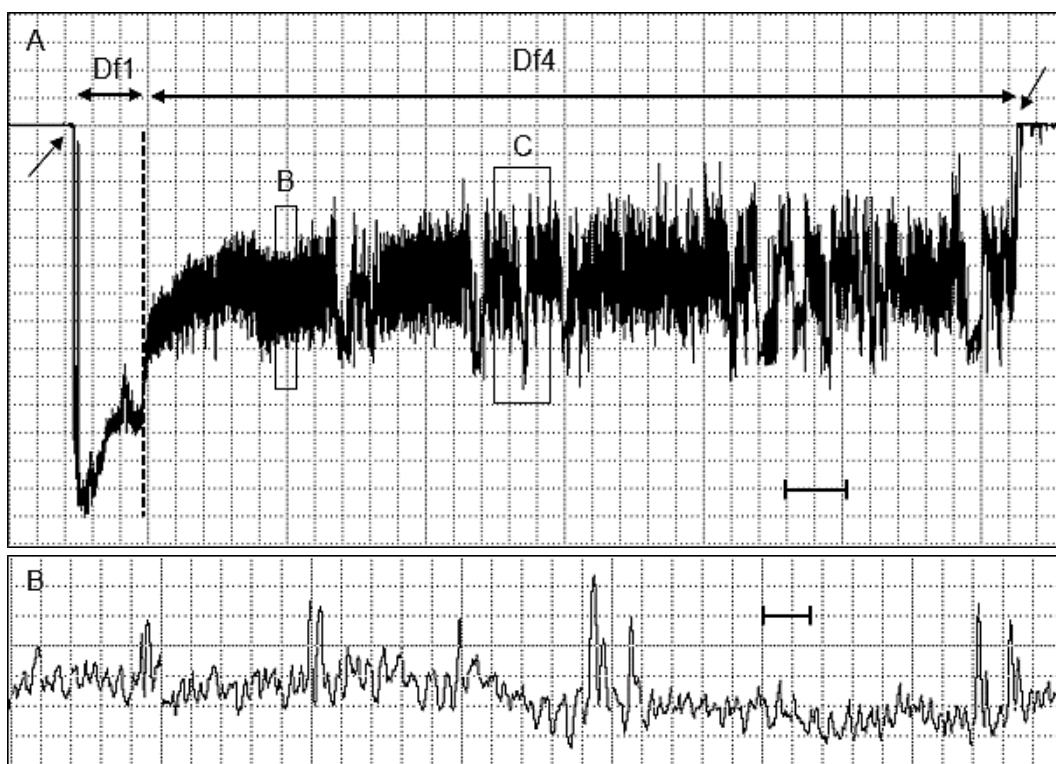


Figura 6 - Forma de onda Df3 gravada usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em colmo de plântula de trigo durante o período vegetativo (estádio V3 - perfilhamento) aplicando um Ri de 10^9 Ohms. Visualização comprimida de um evento alimentar (~50 min) mostrando as formas de onda Df1a (inserção e penetração dos estiletes) e Df3 (atividades de dilaceramento/ maceramento e ingestão) (A). Visualização expandida da forma de onda Df1a e início da forma de onda Df3a (B). Visualização expandida da forma de onda Df3a (C). Detalhe das formas de onda Df3a e Df3b (D). Visualização expandida da forma de onda Df3b (E, F). Figura A tem Windaq compressão 400 [80 s/divisão vertical], ganho de 16x. B tem compressão 6 [1,2 s/divisão vertical], ganho de 16x. C tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 32x. D tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 32x. E-F tem compressão 2 [0,4 s/divisão vertical], ganho de 32x. Setas indicam o início ou o fim de um evento alimentar. Figura A = barra de escala equivale a 100s, figuras C, E, F = barra de escala equivale a 1s, figuras B, D = barra de escala equivale a 2s.

Df3b foi caracterizada como uma forma de onda regular e de curta duração (em geral segundos), sempre ocorrendo intercalada com a onda Df3a, na seguinte sequência de eventos: Df3a → Df3b → Df3a → Df3b, e assim por diante (Figuras 5D, E, 6D-F). Df3b nem sempre foi claramente separada dentre das gravações, ou talvez pode não estar ocorrendo por alguma razão desconhecida. Em ambos os níveis de Ri, 10^7 e 10^9 Ohms, Df3b mostrou valores de amplitude baixos e similares (15 e 19%, respectivamente), assim como de frequência (3,9 e 4,1 Hz, respectivamente) (Tabela 1). Df3b, assim como Df3a, apresentou diferenças entre os níveis de Ri aplicados, entre os percevejos e também dentro da gravação do mesmo inseto.

A onda Df4 também foi dividida em dois subtipos, nomeadas Df4a e Df4b (Figuras 7A-D, 8A-D), as quais foram observadas apenas quando *D. furcatus* se alimentou na espiga de trigo, mais especificadamente no endosperma da semente. Df4a foi, em geral, precedida por uma curta onda Df1b, e as vezes por Df1a, porém em ambos os casos, muitas vezes, foi difícil separar as ondas Df1a/Df1b e Df4a na gravação, principalmente quando gravadas em 10^9 Ohms (Figura 8A). Df4a foi marcada por sua irregularidade na aparência, muito diferente das ondas Df2 e mesmo da onda Df3a (a qual representa a mesma estratégia alimentar da onda Df4a, porém realizada em tecidos diferentes). Df4a apresentou um alto valor de amplitude quando aplicado 10^7 Ohms (média de 51%) comparado com 10^9 Ohms (35%).



Continua ...

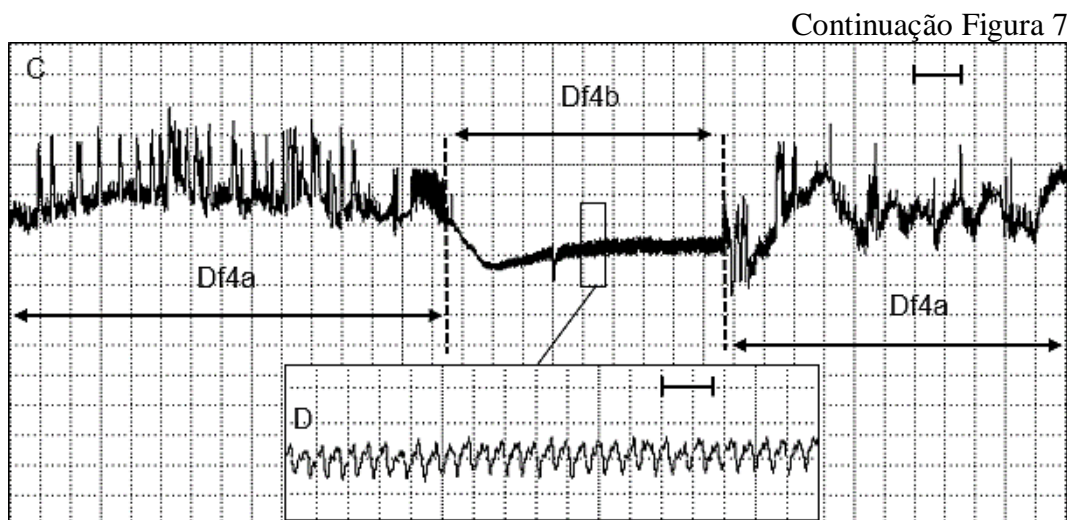


Figura 7 - Forma de onda Df4 gravada usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em espiga de trigo durante o período reprodutivo (estádio R11.1 – grão leitoso) aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Visualização comprimida de um evento alimentar (~140 min) mostrando as formas de onda Df1 (inserção e penetração dos estiletes) e Df4 (atividades de dilaceramento/ maceramento e ingestão) (A). Visualização expandida da forma de onda Df4a (B). Visualização expandida mostrando os detalhes dos subtipos Df4a e Df4b (C). Visualização expandida da forma de onda Df4b (D). Figura A tem Windaq compressão 1200 [240 s/divisão vertical], ganho de 8x. B, D tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 16x. C tem compressão 30 [6 s/divisão vertical], ganho de 8x. Setas indicam o início ou o fim de um evento alimentar. Figura A = barra de escala equivale a 500s, figuras B, D = barra de escala equivale a 1s, figura C = barra de escala equivale a 10s.

Além disso, Df4a foi caracterizada como uma onda de frequência irregular, porém, também apresentou porções regulares (frequência variando de 3,5 a 3,8 Hz) composta por picos orientados tanto quanto positivamente em ambos os níveis de impedância (Figuras 7A-C; 8A-C, Tabela 1). As vezes mesmo dentro de uma mesma gravação, os picos ora eram positivos ora negativos, e essa inversão de orientação não se deve às configurações de gravação. Além do mais, Df4a foi variável em aparência entre os níveis de Ri, mas também entre os percevejos e até mesmo dentro da gravação do mesmo inseto. Por outro lado, a onda Df4b apresentou padrão regular e frequentemente caracterizado como uma curta forma de onda, comparado com Df4a, sempre ocorrendo intercalada com essa última (Figuras 7C, D; 8C, D). Df4b apresentou um valor médio de amplitude (20 e 27% em 10^7 e 10^9 Ohms, respectivamente) e frequência muito regular, variando de 3,5 a 4,0 Hz entre os níveis de impedância (Tabela 1).

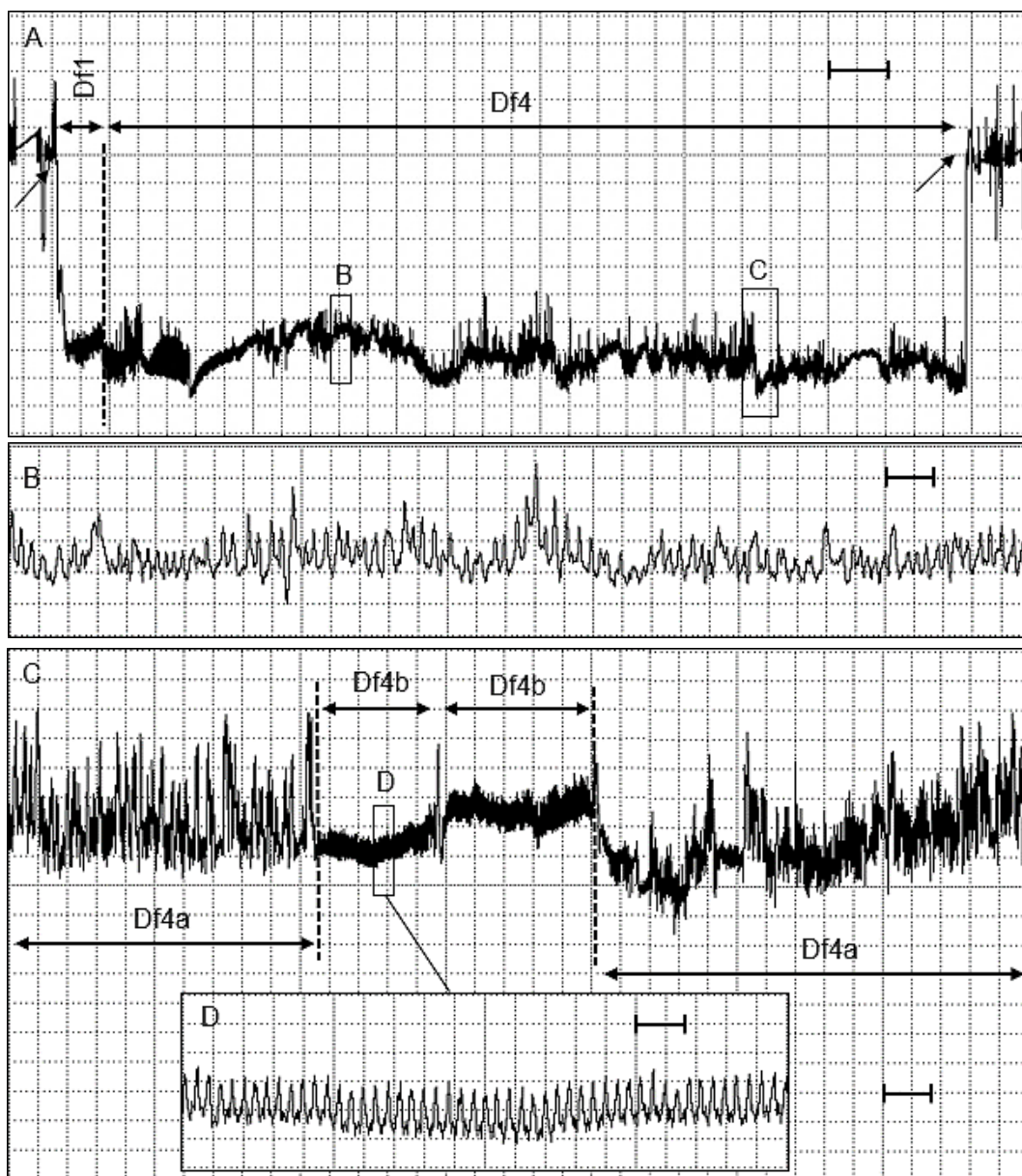


Figura 8 - Forma de onda Df4 gravada usando EPG AC-DC durante as atividades alimentares de *Dichelops furcatus* em espiga de trigo durante o período reprodutivo (estádio R11.1 – grão leitoso) aplicando um Ri de 10^9 Ohms. Visualização comprimida de um evento alimentar (~60 min) mostrando as formas de onda Df1 (inserção e penetração dos estiletes) e Df4 (atividades de dilaceramento/ maceramento e ingestão) (A). Visualização expandida da forma de onda Df4a (B). Visualização expandida mostrando os detalhes dos subtipos Df4a e Df4b (C). Visualização expandida da forma de onda Df4b (D). Figura A tem Windaq compressão 600 [120 s/divisão vertical], ganho de 4x. B tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 16x. C tem compressão 30 [6 s/divisão vertical], ganho de 16x. D tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 32x. Setas indicam o início ou o fim de um evento alimentar. Figura A = barra de escala equivale a 250s, figuras B, D = barra de escala equivale a 1s, figura C = barra de escala equivale a 10s.

Em relação a origem elétrica das formas de onda Df3 e Df4, ambas apresentaram uma mistura de componentes elétricos variando de acordo com o subtipo da onda. Os subtipos Df3a e Df4a, de maneira geral, apresentaram uma redução no valor da amplitude quando aplicado um Ri de 10^9 Ohms comparado com baixo valor de Ri (10^7 Ohms), isso indica que R é o principal componente. Entretanto, esses subtipos ainda permaneceram claramente visíveis em 10^9 Ohms, portanto, ambos subtipos apresentam também o componente emf. Em relação as ondas Df3b e Df4b, essas foram mais enfatizadas quando aplicado uma impedância de 10^9 Ohms, logo, elas apresentam principalmente o componente emf (Tabela 1).

6.3.2 Correlação entre as formas de onda e os sítios alimentares via estudos histológicos

Na onda Df1a gravada durante as atividades alimentares de *D. furcatus* no tecido vegetal da planta de trigo, foi observada em todas os cortes histológicos (em colmo, $n = 10$), a presença de uma bainha salivar rodeando os estiletes (Figura 9A). Além do mais, as pontas da bainha e/ou dos estiletes terminaram em células do parênquima, confirmando que a onda Df1a representa a fase de inserção e penetração dos estiletes e secreção da bainha salivar. Contudo, houve uma diferença importante quanto a secreção da bainha salivar durante Df1a. Quando essa foi gravada antes da onda Df2 ($n = 10$, colmo), a bainha salivar foi secretada por completo (Figura 9B), entretanto, quando Df1a foi gravada antes de Df3a ($n = 5$), ou antes de Df4a ($n = 2$), a bainha salivar não foi secretada completamente (Figuras 9D-F).

Cortes realizados durante a forma de onda Df2 no colmo de trigo, mostraram que em todos os cortes histológicos ($n = 10$), as pontas da bainha salivar e/ou dos estiletes foram encontradas no interior das células do xilema (Figura 9B). Durante a onda Df2 na espiga de trigo, os cortes foram feitos na camada da lema ($n = 2$), e mostraram que os estiletes estavam muito próximos dos vasos do xilema (distribuídos longitudinalmente) no tecido vegetal (Figura 9C). Porém, a imagem não permite esclarecer se a ponta dos estiletes esta ou não dentro dos vasos do xilema.

Durante a onda Df3a (observada apenas em colmos de trigo), a ponta dos estiletes ($n = 5$) sempre esteve posicionada no tecido do parênquima (Figura 9D), e também houve a secreção incompleta da bainha salivar quando essa onda foi gravada (Figura 9E). Na forma de onda Df4a (observada apenas na semente), foi observado nos cortes histológicos ($n = 2$), que a ponta dos estiletes estava posicionada internamente no endosperma da semente, e que não houve a secreção da bainha salivar completamente (Figura 9F, seta vermelha indica o final da bainha salivar).

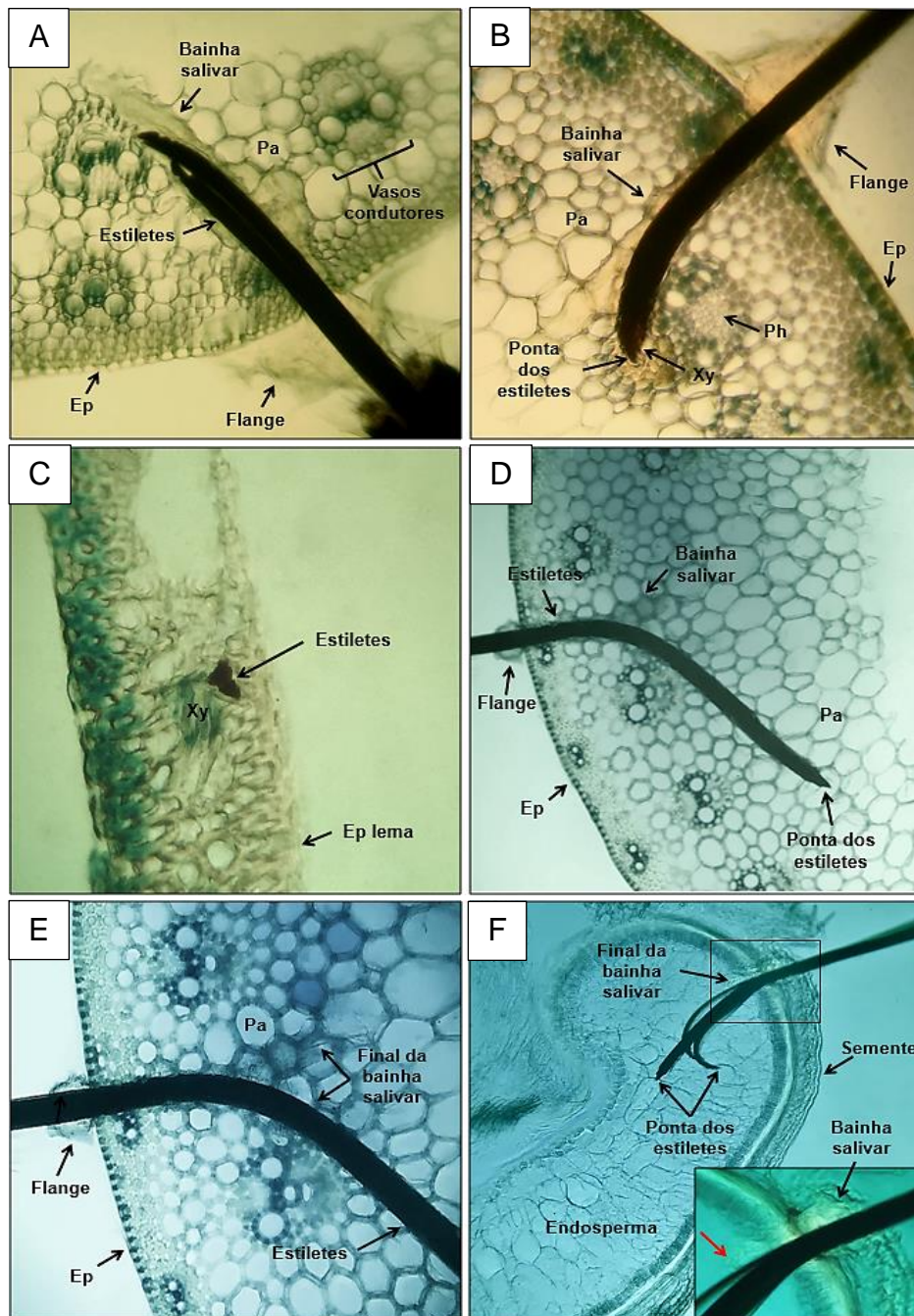


Figura 9 - Cortes histológicos de colmos de trigo (estádio V8) e estruturas da espiga de trigo (estádio R11.1) contendo estiletes seccionados e bainhas salivares do percevejo *Dichelops furcatus*. Bainha salivar terminando no tecido do parênquima durante a forma de onda Df1a no colmo (A). Ponta da bainha salivar e dos estiletes terminando nos vasos do xilema durante a forma de onda Df2 no colmo (B). Ponta dos estiletes próximo dos vasos do xilema durante a forma de onda Df2 na espiga de trigo (camada da lema) (C). Ponta dos estiletes em células do parênquima durante a forma de onda Df3a no colmo (D). Secreção da flange (externamente no colmo) e de uma bainha salivar incompleta (internamente no tecido) durante a onda Df3a (E). Ponta dos estiletes internamente no endosperma da semente durante a forma de onda Df4a e uma bainha salivar incompleta (indica pela seta vermelha no detalhe) secretada internamente no tecido (F). Ep = epiderme, Pa = parênquima, Xy = xilema, Ph = floema.

Além disso, os cortes dos colmos frescos de trigo após a gravação de um evento da forma de onda Df3 ($n = 6$), revelaram uma área visualmente danificada (região de coloração esbranquiçada circundada pela linha vermelha) (Figura 10A). De forma semelhante, cortes feitos em sementes frescas de trigo durante a forma de onda Df4a ($n = 8$), mostraram que os estiletes estavam posicionados no endosperma da semente e que houve a secreção da flange externamente sobre as camadas que a protegem (Figura 10B). Além disso, os cortes feitos nas sementes imaturas, após um evento da onda Df4, mostraram uma área visualmente danificada no endosperma da semente (região de coloração esbranquiçada indicada pela seta vermelha) (Figura 10C).

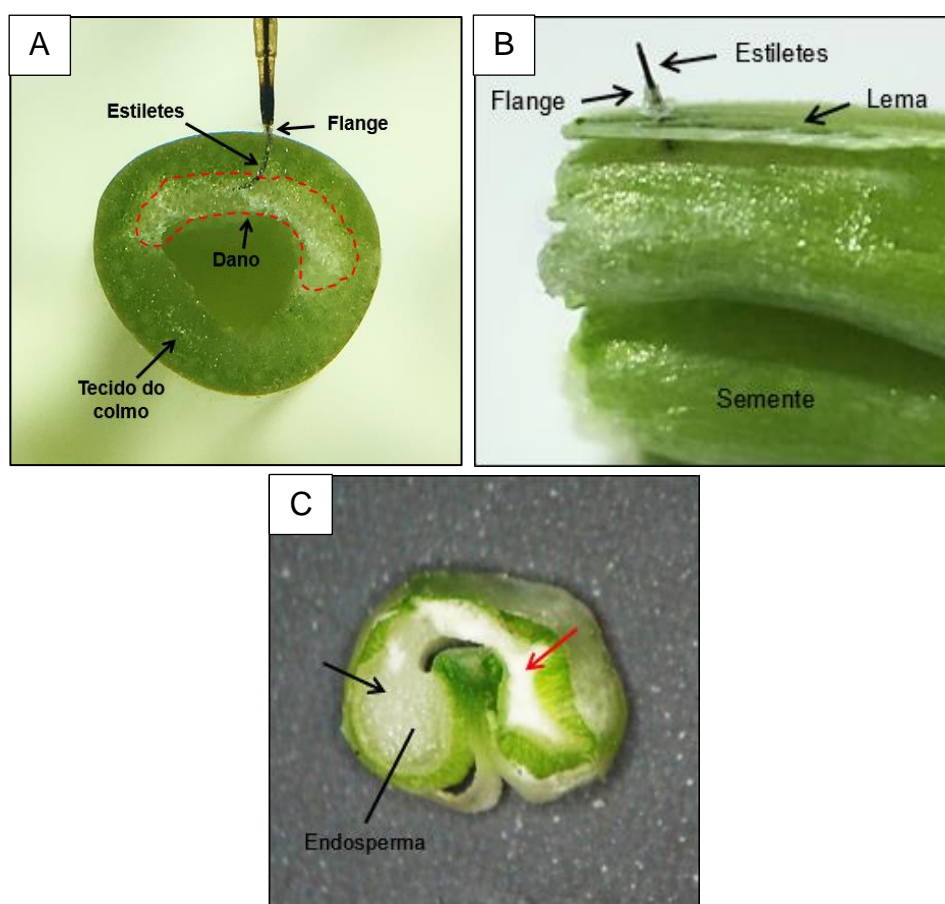


Figura 10 - Corte do colmo fresco (estádio V8) e semente (estádio R11.1) imatura de trigo contendo os estiletes seccionados do percevejo *Dichelops furcatus*. Secção do colmo fresco de trigo contendo estiletes seccionados e mostrando a área com dano visível (região de coloração esbranquiçada circundada pela linha vermelha) após a gravação de um evento da onda Df3 (A). Semente imatura de trigo contendo estiletes seccionados e a flange depositada externamente sobre a camada da lema durante a forma de onda Df4 (B). Secção de uma semente fresca de trigo mostrando a área sem danos (seta preta) e área danificada (região de coloração esbranquiçada indicada pela seta vermelha) após a gravação de um evento da onda df4 (D).

6.4 Discussão

Nesse estudo foi avaliado o padrão alimentar do percevejo *D. furcatus* recentemente encontrado atacando a cultura do trigo na Região Sul do Brasil. Foram descritas sete diferentes formas de onda relacionadas com o processo alimentar do percevejo em colmos (estádio vegetativo - V3) e espigas (estádio reprodutivo - R11.1) de trigo.

Algumas similaridades com outros percevejos, já estudados com a técnica de EPG, foram observadas durante a alimentação do percevejo em ambas as estruturas da planta, assim como algumas peculiaridades também o foram. Uma das mais relevantes é o uso da mesma estratégia de alimentação, nesse caso a ruptura celular (BACKUS et al., 2005 - previamente conhecido com alimentação via dilaceramento e descarga [MILES, 1972]), tanto no colmo quanto na espiga de trigo. Contudo, as ondas gravadas para cada local foram completamente diferentes, isso mostra o quão complexo é o seu processo alimentar. Além do mais, quando o mesmo percevejo se alimentou dos vasos do xilema, ele mesmo utilizou uma outra estratégia alimentar, nesse caso a chamada bainha salivar, como foi demonstrado nas análises histológicas.

Trabalhos já publicados demonstram que uma mesma espécie de percevejo pode empregar apenas uma dessas estratégias, como observado para *E. meditabunda* (LUCINI; PANIZZU, 2016) que usa a bainha salivar ao se alimentar de hastes de soja, ou ambas as estratégias como relatado para *P. guildinii* (LUCINI et al., 2016) em plantas de soja e para *D. melacanthus* em plântulas de milho (LUCINI; PANIZZU, 2017). A escolha de uma ou de ambas estratégias parece estar relacionada com o sítio alimentar explorado pela espécie de percevejo. Aqui, nós mostramos que *D. furcatus* ao se alimentar de plantas de trigo utiliza ambas as estratégias alimentares, variando de acordo com o local explorado durante sua alimentação.

Fase de inserção e penetração dos estiletes (Df1). Essa fase é representada por uma única forma de onda - DF1, dividida em dois subtipos, Df1a e Df1b. Df1a foi a primeira forma de onda relacionada com as atividades alimentares do percevejo na planta de trigo, e foi observada em ambas as estruturas vegetais, colmo e espiga de trigo. O outro subtipo, Df1b, foi gravado apenas nos percevejos que se alimentaram na espiga de trigo. O subtipo Df1a representa a inserção e penetração profunda dos estiletes no tecido vegetal, e também a secreção de saliva geleificante para a formação da bainha salivar como foi observado em todas as imagens histológicas feitas no colmo de trigo durante esta forma de onda. Além

disso, frequentemente foram observadas a secreção de flanges (saliva geleificante depositada externamente) sobre o colmo e também sobre as estruturas que compõe a espiga de trigo.

Trabalhos com EPG desenvolvidos por Lucini e Panizzi (2016, 2017) e Lucini et al. (2016) com outras espécies de percevejos pentatomídeos, mostraram que a fase de inserção e penetração dos estiletes esteve correlacionada, via estudos histológicos, com a secreção da bainha salivar. Sendo essa completa ou incompleta, dependendo da estratégia alimentar empregada pelo percevejo. A secreção completa é reportada para ocorrer quando o local de alimentação são os vasos dos tecidos condutores - xilema e floema (BONANI et al., 2010; BACKUS et al., 2013; PEARSON et al., 2014; LUCINI; PANIZZU, 2016, 2017; LUCINI et al., 2016; SEO et al., 2016). Enquanto que a secreção incompleta ocorre durante a estratégia de ruptura celular (MILES, 1972). Do mesmo modo, foi observado nas imagens histológicas de *D. furcatus* em colmo de trigo, que durante as atividades alimentares no xilema houve a secreção completa da bainha salivar a qual acompanhou o percurso dos estiletes até os vasos.

Porém, durante as atividades de ruptura celular no colmo e na semente, houve a secreção parcial da bainha salivar a qual circundou os estiletes no início de sua inserção, assim como observado para *D. melacanthus* em colmos de plântulas de milho (LUCINI; PANIZZU, 2017). No único corte histológico obtido na espiga (semente), durante as atividades de ruptura celular, não foi observada a presença de uma bainha salivar em torno dos estiletes no endosperma da semente. Contudo, nos cortes de sementes imaturas e frescas, após a ocorrência dessa atividade, foi observada a presença de flanges externamente sobre as estruturas da espiga, indicando que houve a secreção de saliva geleificante na fase de inserção e penetração dos estiletes que antecedeu as atividades de ruptura celular.

Por outro lado, o subtipo Df1b nem sempre esteve presente, mas foi visualmente correlacionado com movimentos de extensão e retração dos estiletes no tecido da espiga, principalmente quando o percevejo iniciou a inserção dos estiletes na gluma (camada mais externa) e na lema (camada abaixo da gluma e que envolve a semente). Contudo, durante as gravações no colmo para a realização dos cortes histológicos, nós também, às vezes, observamos a presença da onda Df1b, isso porque os colmos utilizados para fazer os cortes estavam mais desenvolvidos e rígidos (estádio V8). Nós acreditamos que essa forma de onda representa a necessidade de superar alguma barreira física que o percevejo encontrou e que dificulta a penetração dos seus estiletes no tecido vegetal. As estruturas que compõem a espigueta do trigo são muito rígidas, pois são as únicas camadas responsáveis pela proteção da semente.

Uma onda muito similar com a Df1b, nomeada Pg1d, foi reportada para *P. guildinii* ao se alimentar em diferentes partes da vagem de soja antes de atingir o endosperma da semente. Pg1d foi correlacionada com o percevejo forçando os estiletes para baixo, e subsequentemente retraindo os mesmos para cima, indicando a presença de uma camada de células mais rígida (camada de esclerênquima observada nas análises histológicas de vagens de soja) que dificultava a penetração dos estiletes, requerendo assim, a dilaceração dessa camada para atingir a semente (LUCINI et al., 2016).

Fase de ingestão. Ingestão de seiva dos vasos do xilema no colmo e na espiga (Df2). A forma de onda Df2 foi gravada no colmo e também na espiga de trigo. Nessa última, a onda Df2 foi observada quando o percevejo se alimentou em qualquer uma das estruturas que compõe a espiga de trigo (pálea, gluma, lema e arista). Df2 foi correlacionada via histologia de tecidos com atividades nos vasos do xilema, mais especificadamente ingestão de seiva. Tanto no colmo quanto na espiga e também entre os níveis de Ri, a onda Df2 foi muito semelhante e foi caracterizada por repetitivas porções de ondas regulares e intercaladas com picos. Essa onda foi fortemente similar em aparência com a forma de onda Dm2 de *D. melananthus* ao se alimentar em colmo de milho (LUCINI; PANIZZI, 2017), a qual também foi correlacionada via estudos histológicos com ingestão no xilema. Além do mais, ambas as ondas compartilham características elétricas, tais como alto valor de amplitude em Ri 10^9 Ohms, e mistura de origens elétricas para os picos (R e emf) e onda (emf).

Praticamente todos os percevejos avaliados em ambas as estruturas vegetais se alimentaram nos vasos do xilema, mas, geralmente, isso não foi repetido mais de uma vez por cada inseto. Isso provavelmente é uma estratégia para evitar a desidratação e manter o balanço hídrico corporal, assim como observado em outros insetos sugadores, tais como afídeos e psílídeos (SPILLER et al., 1990; BONANI et al., 2010; POMPON et al., 2010) e também em percevejos (LUCINI; PANIZZI, 2016). No caso da ingestão de água durante a alimentação na semente de trigo, essa também pode ser uma estratégia, uma vez que a semente é altamente concentrada em nutrientes (PANIZZI; SLANSKY, 1985) e precisa desse balanceamento de concentração, da mesma forma como relatado para *P. guildinii* ao se alimentar do endosperma de semente de soja (LUCINI et al., 2016).

Fase de ingestão. Atividades alimentares no colmo (Df3). No colmo de trigo, *D. furcatus* produziu uma outra forma de onda, nomeada Df3, a qual foi dividida em dois subtipos, Df3a e Df3b. O primeiro subtipo representa uma nova estratégia alimentar utilizada pelo percevejo

no colmo, nesse caso a ruptura celular. Durante esse subtipo de onda, foi observado visualmente o movimento rápido, contínuo e profundo dos estiletes no tecido do colmo. Tal atividade é reportada na literatura para acontecer durante as atividades de dilaceramento (ação mecânica dos estiletes) (MILES, 1972) a qual faz parte da estratégia de ruptura celular.

Esse comportamento também é reportado para outros insetos sugadores que empregam a ruptura celular como estratégia de alimentação, tais como: nas cigarrinhas *Empoasca fabae* (Harris), *E. kraemeri* (Ross & Moore) (CALDERON; BACKUS, 1992), e *Empoasca vitis* Göthe (JIN et al., 2012), para os percevejos *Lygus hesperus* Knight (CLINE; BACKUS, 2002), *P. guildinii* (LUCINI et al., 2016) e *D. melacanthus* (LUCINI; PANIZZI, 2017). Nessa última espécie, uma das ondas gravadas em colmos de plântulas de milho (chamada de Dm3a), foi observado que o percevejo moveu seus estiletes no tecido vegetal (LUCINI; PANIZZI, 2017), da mesma forma como observado aqui para a onda Df3a de *D. furcatus* em colmo de trigo. Além do mais, durante a onda Df3a, houve a formação de uma bainha salivar incompleta, assim como reportado para *D. melacanthus* e *P. guildinii* usando a estratégia de ruptura celular.

Por outro lado, durante o subtipo Df3b foi visualmente observado que os estiletes permaneceram imóveis internamente no tecido vegetal por um curto período de tempo, e em seguida, os estiletes moveram-se novamente (onda Df3a). Portanto, Df3b representa a ingestão do conteúdo celular degradado (composta por células do parênquima e possivelmente células dos vasos condutores) pelas atividades de dilaceramento e maceramento, como relatado durante a onda Dm3b de *D. melacanthus* (LUCINI; PANIZZI, 2017). Contudo, a forma de onda Df3b não foi claramente distinguida e/ou registrada em todas as gravações em que a onda Df3a foi gravada. Sendo assim, nós acreditamos que durante a onda Df3a, pode estar ocorrendo também o processo de ingestão simultaneamente com as atividades de dilaceramento e maceramento das células do colmo, assim como relatado para *D. melacanthus* durante a onda Dm3a (LUCINI; PANIZZI, 2017).

Além das semelhanças no comportamento desses dois percevejos (*D. melacanthus* e *D. furcatus*), os subtipos Dm3a/Df3a e Dm3b/Df3b apresentam muitas similaridades entre si, tanto na aparência quanto nas características elétricas. Nas imagens histológicas feitas durante a forma de onda Df3a, não foi possível se observar uma área ou células danificadas na região de inserção dos estiletes. Porém, em cortes frescos do colmo de trigo foi possível observar regiões nitidamente danificadas de coloração branca opaca. Além do mais, após um período de tempo da ocorrência das atividades de ruptura celular, foram observados danos visíveis nas

folhas de trigo (Figura 11A, setas), sendo que em alguns casos ocasionou a morte da folha central, sintoma conhecido como “coração morto” (Figura 11B, indicada pela seta).

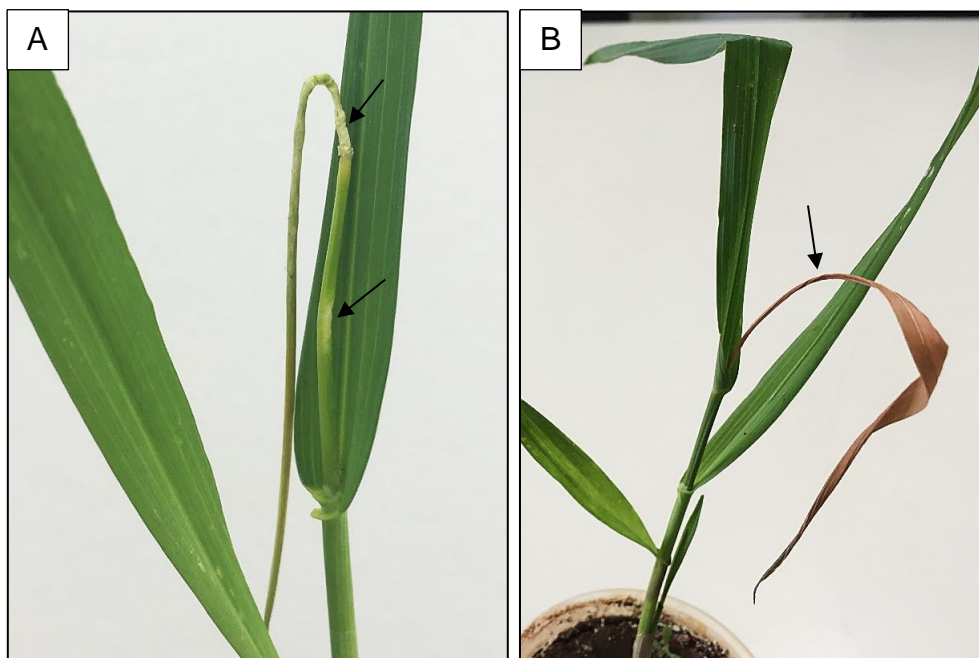


Figura 11 - Danos (setas) provocados pelas atividades alimentares, via ruptura celular, do percevejo *Dichelops furcatus* mantido no colmo de plântulas de trigo (estádio V3) por um período de 8 horas. Danos em diferentes regiões da folha central (A). Morte da folha central “coração morto” (B).

Fase de ingestão. Atividades alimentares no endosperma da semente (Df4). Na semente de trigo, *D. furcatus* também empregou a estratégia de ruptura celular, representada pela forma de onda Df4 (Df4a e Df4b), da mesma forma como no colmo. Durante a onda Df4a foi observado visualmente o movimento contínuo e profundo dos estiletes no endosperma da semente de trigo, assim como observado durante a forma de onda Pg3a gravada para *P. guildinii* ao se alimentar no endosperma da semente de soja. Portanto, a onda Df4a representa a dissolução de células do endosperma via dilaceramento (ação dos estiletes) e maceramento (ação enzimática - enzimas digestivas secretadas na saliva aquosa). Durante esta forma de onda, observou-se uma bainha salivar em torno dos estiletes apenas no início do ponto de sua inserção no endosperma da semente, isto é, a bainha salivar foi secretada de forma incompleta no interior do tecido, a qual foi observada nas secções histológicas.

Em cortes feitos em sementes imaturas de trigo, logo após a gravação da onda Df4, foram observados danos no endosperma da semente causados pelas atividades de

dilaceramento, maceramento e ingestão, assim como observado para *P. guildinii* durante a forma de onda Pg3 gravada no endosperma da semente de soja (LUCINI et al., 2016).

Por outro lado, durante o subtipo Df4b os estiletes de *D. furcatus* estavam imóveis dentro do tecido da semente por um breve período de tempo, e após isso, moveram-se novamente para romper novas células (Df4a). Essa atividade foi sendo repetida continuamente, porém o percevejo passou a maior parte do tempo nas atividades de dilaceramento e maceramento preparando o alimento para em seguida ingerir, atividade essa que demorava, em geral, poucos instantes.

Em conclusão, os resultados obtidos aqui demonstram que a alimentação de *D. furcatus* em plantas de trigo durante o período vegetativo (colmo) e reprodutivo (espiga) utiliza duas estratégias de alimentação diferentes alternando de acordo com o local de alimentação explorado. Quando se alimentou nos vasos do xilema (ingestão de líquido) no colmo e na espiga de trigo, *D. furcatus* empregou a estratégia da bainha salivar, a qual foi secretada completamente. Enquanto que, ao se alimentar no endosperma de sementes e novamente no colmo, o percevejo empregou também a estratégia de ruptura celular, na qual o inseto usa as táticas de dilaceramento e maceramento para romper um “pacote” de células para depois ingerir o conteúdo celular degradado. Durante esta estratégia, uma bainha salivar também foi observada no tecido vegetal, no entanto, não foi completamente formada. Os resultados mostram o quão sofisticado é o comportamento alimentar dos percevejos, demonstrando que eles podem mudar sua estratégia de acordo com o local de alimentação, e essas mudanças afetam muito alguns comportamentos específicos, como os períodos de salivação e ingestão de alimento.

6.5 Referências

- ÁVILA, C. J.; PANIZZI, A. R. Occurrence and damage by *Dichelops* (*Neodichelops*) *melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) on corn. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 193-194, 1995.
- BACKUS, E. A.; BENNETT, W. H. The AC-DC Correlation Monitor: new EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing-sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 869-884, 2009.
- BACKUS, E. A.; RANGASAMY, M.; STAMM, M.; MCAUSLANE, H. J.; CHERRY, R. Waveform library for chinch bugs (Hemiptera: Heteroptera: Blissidae): characterization of electrical penetration graph waveforms at multiple input impedances. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, p. 524-539, 2013.

- BACKUS, E. A.; SERRANO, M. S.; RANGER, C. M. Mechanisms of hopperburn: An overview of insect taxonomy, behavior, and physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 125-151, 2005.
- BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DAGLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, p. 35-49, 2010.
- BUNTIN, G. D.; GREENE, J. K. Abundance and species composition of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) in Georgia winter wheat. **Journal of Entomological Science**, v. 39, p. 287-290, 2004.
- CALDERON, J. D.; BACKUS, E. A. Comparison of the probing behaviors of *Empoasca fabae* and *E. kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) on resistant and susceptible cultivars of common beans. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 88-99, 1992.
- CHIARADIA, L. A.; REBONATTO, A.; SMANIOTTO, M. A.; DAVILA, M. R. F.; NESI, C. N. Arthropods associated with soybean crops. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, p. 29-36, 2011.
- CHOCOROSQUI, V. R.; PANIZZI, A. R. Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 487-492, 2004.
- CLINE, A. R.; BACKUS, E. A. Correlations among AC electronic monitoring waveforms, body postures, and stylet penetration behaviors of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). **Environmental Entomology**, v. 31, p. 538-549, 2002.
- FERREIRA, E.; SILVEIRA, P. M. Dano de *Thyanta perditor* (Hemiptera: Pentatomidae) em trigo (*Triticum aestivum* L.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 20, p. 165-171, 1991.
- FROTA, R. T.; SANTOS, R. S. S. Pentatomidae bugs associated with sunflower crops in the northwest of Rio Grande do Sul state and the action of *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae) on sunflower seeds. **Biotemas**, v. 20, p. 65-71, 2007.
- JIN, S.; CHEN, Z. M.; BACKUS, E. A.; SUN, X. L.; XIAO, B. Characterization of EPG waveforms for the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), on tea plants and their correlation with stylet activities. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 1235-1244, 2012.
- KOCH, R. L.; RICH, W. A.; PAHS, T. Statewide and season-long surveys for Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera) of Minnesota wheat. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 396-404, 2016.
- LARGE, E. C. Growth stages in cereals. Illustration of the Feekes scale. **Plant Pathology**, v. 3, p. 128-129, 1954.

LUCINI, T.; PANIZZZI, A. R. Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa meditabunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring pentatomids for EPG. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, p. 118-132, 2016.

LUCINI, T.; PANIZZZI, A. R. Feeding behavior of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) on maize seedlings: an EPG analysis at multiple input impedances and histology correlation. **Annals of the Entomological Society of America** v. 110, *in press*, 2017.

LUCINI, T.; PANIZZZI, A. R.; BACKUS, E. A. Characterization of an EPG waveform library for redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), on soybean plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 198-210, 2016.

MILES, P. W. The saliva of Hemiptera. **Advances in Insect Physiology**, v. 9, p. 183-255, 1972.

PANIZZZI, A. R.; AGOSTINETTO, A.; LUCINI, T.; PEREIRA, P. R. V. S. Effect of green-belly stink bug, *Dichelops furcatus* (F.) on wheat yield and development. **Crop Protection**, v. 79, p. 20-25, 2016.

PANIZZZI, A. R.; CORRÊA, B. S.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B.; NEWMAN, G. G.; TURNIPSEED, S. G. **Insects of Soybean in Brazil**. Embrapa Soja, Boletim Técnico 1, 1977.

PANIZZZI, A. R.; SLANSKY JR, F. Legume host impact on performance of adult *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, v. 14, p. 237-242, 1985.

PEARSON, C. C.; BACKUS, E. A.; SHUGART, H. J.; MUNYANEZA, J. E. Characterization and correlation of EPG waveforms of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioziidae): Variability in waveform appearance in relation to applied signal. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, p. 650-666, 2014.

PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R.; LAU, D.; MARSARO JR, A. L.; PANIZZZI, A. R. **Trigo: Manejo Integrado de Pragas**. Embrapa Trigo, Documento Número 113, 2013.

POMPON, J.; QUIRING, D.; GIORDANENGO, P.; PELLETIER, Y. Role of xylem consumption on osmoregulation in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 610-615, 2010.

ROZA-GOMES, M. F.; SALVADORI, J. R.; PEREIRA, P. R. S. V.; PANIZZZI, A. R. Injuries of four species of stink bugs to corn seedlings. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1115-1119, 2011.

SEO, B. Y.; JUNG, J. K.; PARK, C. G.; LEE, S. G.; PARK, Y. L. Plant penetration activities by the flatid planthopper *Metcalfa pruinosa* (Hemiptera: Fulgoroidea): an electrical penetration graph-histology analysis. **Journal of Applied Entomology**, v. 140, p. 706-714, 2016.

SMANIOTTO, L. F.; PANIZZI, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the neotropics. **Florida Entomologist**, v. 98, p. 7-17, 2015.

SPILLER, N. J.; KOENDERS, L.; TJALLINGII, W. F. Xylem ingestion by aphids - a strategy for maintaining water balance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 55, p. 101-104, 1990.

TJALLINGII, W. F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, p. 721-730, 1978.

TJALLINGII, W. F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 177-186, 1985.

WALKER, G. P. A beginner's guide to electronic monitoring of homopteran probing behavior, pp. 14-40. In: WALKER, G. P.; BACKUS, E. A. (Eds.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. Entomological Society of America, Lanham, Academic Press, 260 p, 2000.

CAPÍTULO VII

Comparações comportamentais de ingestão e excreção de diferentes espécies de percevejos pentatomídeos em diferentes fontes alimentares

7.1 Introdução

A maioria dos percevejos (Heteroptera: Pentatomidae) alimentam-se de estruturas reprodutivas das plantas, frutos e sementes imaturas (SCHUH; SLATER, 1995), pois estas são compostas de “pacotes” de células ricas em nutrientes essenciais e facilmente alcançáveis (SLANSKY; PANIZZI, 1987). No entanto, algumas espécies são conhecidas por preferir estruturas vegetativas para se alimentar. Por exemplo, o percevejo do arroz *Tibraca limbativentris* Stål prefere se alimentar em colmos de plantas de arroz *Oryza sativa* L. (RIZZO, 1976), e o percevejo asa-preta da soja *Edessa meditabunda* (F.) tem preferência por hastes de plantas de soja ao invés de vagens (GALILEO; HEINRICHS, 1979; SILVA et al., 2012).

De uma maneira diferente, o percevejo verde pequeno, *Piezodorus guildinii* (Westwood), e o percevejo barriga-verde, *Dichelops melacanthus* (Dallas), são reportados por preferir se alimentar de sementes imaturas de soja *Glycine max* (L.) Merrill. No entanto, *D. melacanthus*, quando confrontado com baixa disponibilidade deste alimento, tem sido observado se alimentando de estruturas vegetativas de gramíneas, como milho *Zea mays* (L.) e trigo *Triticum aestivum* L. (ÁVILA; PANIZZI, 1995; CHOCOROSQUI; PANIZZI, 2004; MANFREDI-COIMBRA et al., 2005).

A hipótese é de que insetos sugadores requerem mais tempo e/ou maior número de repetições de alimentação para obter os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento/reprodução quando se alimentam em estruturas vegetativas em comparação com estruturas reprodutivas. Isto porque, em tecidos vegetativos, eles exploraram o sistema vascular, xilema e floema, os quais têm elevado teor de água e baixos teores de nutrientes em comparação com as sementes (SLANSKY; SCRIBER, 1985; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Um estudo recente utilizando o monitoramento elétrico (EPG) das atividades alimentares de *E. meditabunda* em hastes de plantas de soja mostrou que esses se alimentam de tecidos vasculares, principalmente nos vasos do xilema, repetidamente e por longos períodos de tempo (LUCINI; PANIZZI, 2016). Assim, nós suspeitamos que os percevejos que

se alimentam de estruturas vegetativas (colmo/haste, por exemplo) produzem maior quantidade de excreções (maior número e tamanho de gotas) do que os insetos que se alimentam de estruturas reprodutivas (sementes).

Portanto, os objetivos deste estudo foram: 1) determinar a frequência (número de eventos de alimentação) e tempo (duração dos eventos de alimentação) de *E. mediotabunda* em haste de soja, *P. guildinii* em haste e semente de soja e *D. melacanthus* em colmo de milho (plântulas). 2) investigar o número e o tamanho das gotas de excreção (isto é, manchas marcadas no papel hidrossensível) produzidos por *D. melacanthus* ao se alimentar em dois substratos diferentes, semente de soja úrgida e colmo de plântulas de milho.

7.2 Materiais e Métodos

7.2.1 Criação dos percevejos

Adultos de *E. mediotabunda*, *P. guildinii*, e *D. melacanthus* foram coletados em campos de cultivo e levados ao laboratório de entomologia da Embrapa Trigo localizado em Passo Fundo, RS, Brasil (28° 15'S, 52° 24'O), onde foram colocados em gaiolas plásticas de criação (25 x 20 x 20 cm) revestida com papel filtro. As gaiolas foram mantidas em câmara de criação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 horas (luz : escuro). Como alimento, foi fornecida uma fonte alimentar padrão utilizado para criação de percevejos em laboratório, composta por vagens frescas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), sementes de soja maduras, amendoim cru em grão (*Arachis hypogaea* L.) e frutos (bagas) de ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait., que foi substituído duas vezes por semana. Para manter a colônia, os ovos foram recolhidos das gaiolas de criação e colocadas dentro de caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) para criar as ninfas, e posteriormente obter os adultos que foram usados nos testes.

7.2.2 Gravações de EPG

O comportamento alimentar de *E. mediotabunda*, *P. guildinii* e *D. melacanthus* foi gravado utilizando a técnica de EPG (gráfico de penetração elétrica). Nesta ferramenta, os insetos e as plantas fazem parte de um circuito elétrico simples, onde uma corrente elétrica circula na interface inseto-planta. Após a inserção dos estiletes (aparelho bucal dos percevejos) no tecido da planta, o circuito elétrico é fechado, e as formas de onda, que representam as atividades de alimentação, são captadas e registradas pelo monitor de EPG. *E.*

meditabunda e *P. guildinii* foram avaliados na haste de soja [(nos estádios V1 e V2, respectivamente, da escala de Fehr et al. (1971)], e, além disso, a última espécie foi avaliada em vagens de soja, ou seja, no endosperma da semente durante a fase de enchimento de grão [(estádio R5 de acordo com Fehr et al. (1971)]. *D. melacanthus* foi avaliada em colmos de plântulas de milho [(estádios V2-V3 da escala de Ritchie e Hanway (1989)].

Todas as espécies avaliadas tiveram seu comportamento alimentar registrados continuamente durante 8 horas. *Edessa meditabunda* foi gravada utilizando um monitor DC, modelo Giga-8 (EPG-Systems, Wageningen, The Netherlands) (TJALLINGII, 1988), aplicando uma impedância de entrada fixa de 10^9 Ohms, e sinal DC (corrente contínua). Para as outras duas espécies foi utilizado o novo monitor AC-DC (BACKUS; BENNETT, 2009; EPG Technologies, Inc., Gainesville, FL, EUA), nas quais foi aplicado um sinal AC (corrente alternada), e diferentes níveis de impedância de entrada (a partir de 10^6 até 10^{13} Ohms), porém foram utilizados apenas dados gravados com 10^7 Ohms para calcular os parâmetros de EPG. A metodologia completa para gravar o comportamento alimentar dessas espécies pode ser encontrada em Lucini e Panizzi (2016) e Lucini et al. (2016).

7.2.3 Número de gotas de fezes excretadas por *D. melacanthus*

Vinte caixas de plástico - arenas (11 x 11 x 3,5 cm) foram revestidas com papel sensível à água (Syngenta, Suíça). Dentro de dez arenas foram adicionadas uma semente de soja túrgida (sementes foram embebidas em água durante 24 horas antes da utilização) (Figura 1A). Nas outras dez arenas foram adicionadas uma plântula de milho (estádio V2), mantida em algodão umedecido em água, em cada arena (Figura 1B). Fêmeas de idade semelhante (7-10 dias) foram separadas da colônia de laboratório e mantidas numa gaiola de criação sem alimento (período de jejum) durante 15 horas antes de serem usadas no experimento.

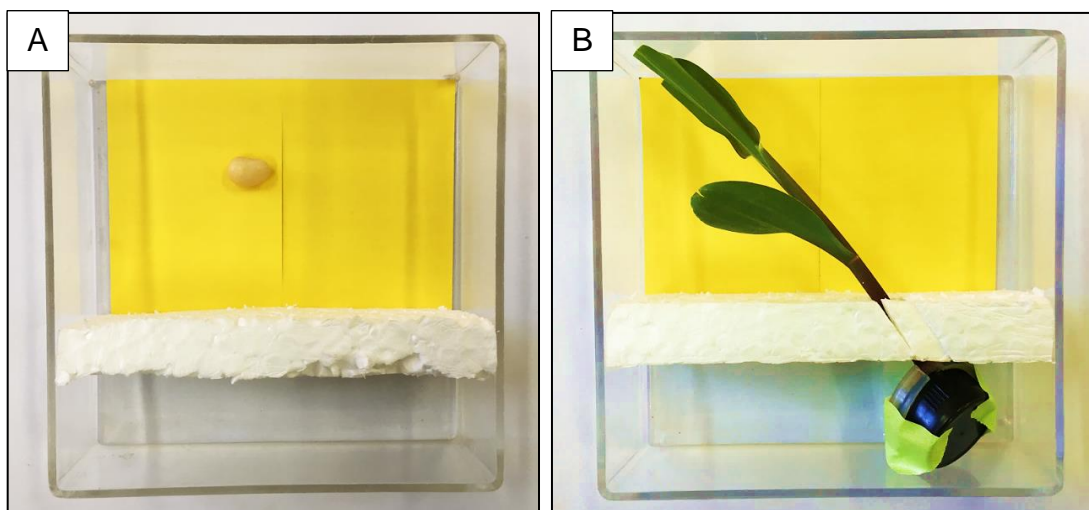


Figura 1 – Caixas plásticas (arenas) revestidas com papel sensível à água (cartão amarelo) utilizadas no experimento. Semente de soja túrgida em água (A), e plântula de milho (estádio V2) mantida em algodão umedecido em água dentro de uma tampa plástica isolada do papel hidrosensível (B).

Depois desse período, uma fêmea foi colocada em cada arena, e em seguida, as arenas foram mantidas em sala de criação com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ de umidade relativa, e um fotoperíodo de 14:10 horas (luz : escuro). Após 24 horas, foram avaliadas as seguintes variáveis: número médio de gotas (fezes) excretadas, a área de cada gota, o número de gotas $<1,5\text{ mm}$, e o número de gotas $> 2,0\text{ mm}$. Para determinar as últimas três variáveis, cada arena foi fotografada usando um telefone celular e, em seguida, as fotos foram analisadas utilizando o software ImageJ, v.1.47 (National Institutes of Health, Maryland, USA).

7.2.4 Variáveis de EPG e análise estatística

Os seguintes parâmetros de EPG foram calculados e determinados para cada forma de onda relacionada com a alimentação em cada espécie de percevejo avaliado: NWEI (número de eventos de uma forma de onda realizada por cada inseto), WDI (duração de uma forma de onda por inseto), e WDEI (duração do evento de uma forma de onda realizada por cada inseto) de acordo com Backus et al. (2007). Os parâmetros de EPG foram calculados com base nas bibliotecas de formas de onda publicados para *E. meditabunda* (LUCINI; PANIZZZI, 2016), *D. melacanthus* (LUCINI; PANIZZZI, 2017) e para *P. guildinii* (LUCINI et al., 2016).

Para os parâmetros de EPG [número de eventos da forma de onda/inseto (NWEI), duração de uma forma de onda por inseto (WDI) e duração do evento da forma de onda/inseto (WDEI)], os dados foram primeiramente submetidos ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias. Os valores de P para NWEI, WDI e WDEI utilizando este teste foram $2,2 \times 10^{-16}$, $2,5 \times 10^{-7}$ e $4,1 \times 10^{-3}$ respectivamente, e, assim, conclui-se que os dados destes parâmetros não se encaixam numa distribuição normal. Portanto, a comparação dos parâmetros entre as espécies de percevejos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Por fim, o teste de comparação de médias de Duncan ($P < 0,05$) foi aplicado para separar as médias das espécies de percevejos em cada parâmetro.

As médias das variáveis relacionadas à excreção de gotas de fezes (número médio de gotas excretadas, área de cada gota, e os grupos de diâmetro) foram separadas por meio do teste *t* de Student ($P < 0,05$). Todas as análises foram feitas utilizando o programa estatístico R, v.3.0.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

7.3 Resultados

A análise não paramétrica de Kruskal-Wallis indicou diferenças estatísticas para todos os parâmetros de EPG, os quais foram altamente significativos entre as espécies de percevejos se alimentando em suas respectivas fontes alimentares (NWEI: $\chi^2 = 46,3$; $P < 0,001$; WDI: $\chi^2 = 38,6$; $P < 0,001$; WDEI: $\chi^2 = 35,9$; $P < 0,001$). A avaliação (EPG) do comportamento alimentar do percevejo *E. meditabunda* na haste de soja, demonstrou que cada percevejo ($n = 25$) repetiu os eventos de alimentação (ingestão de seiva do xilema e do floema) mais de quatro vezes durante as 8 horas de gravação (Figura 2). A duração do período de alimentação para cada inseto foi cerca de 210 minutos (Figura 3), e a duração de cada evento foi cerca de 53 minutos (Figura 4).

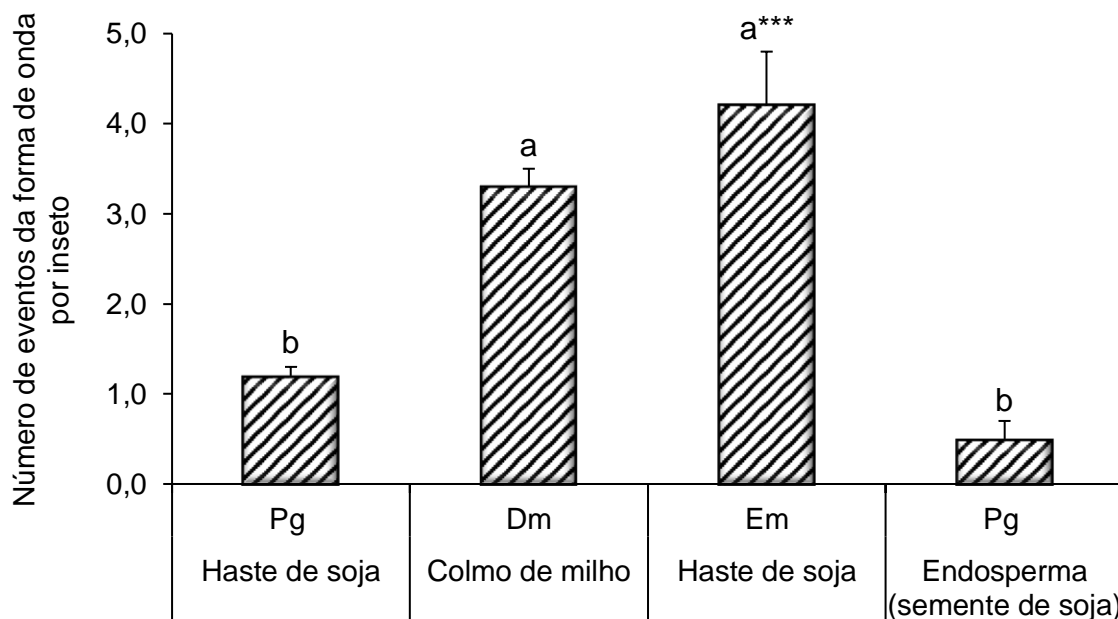


Figura 2 - Média (\pm EP) do número de eventos das formas de onda relacionadas com alimentação realizada por cada inseto (NWEI) registrado por meio da técnica de EPG durante as atividades alimentares de três espécies de pentatomídeos (Pg = *Piezodorus guildinii*; Dm = *Dichelops melacanthus*; e Em = *Edessa meditabunda*), em estrutura vegetativa (haste/colmo) e reprodutiva (semente) de diferentes plantas. *P. guildinii* alimentando-se em haste de soja ($n = 25$) e vagem de soja (endosperma da semente) ($n = 17$), *E. meditabunda* em haste de soja ($n = 25$), e *D. melacanthus* no colmo de plântulas de milho ($n = 21$). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$; testes de Kruskal-Wallis e Duncan). ***significativo a $P < 0,001$.

Para as gravações de EPG (durante 8 horas) do percevejo *D. melacanthus* em colmo de plântulas de milho foi observado que cada inseto dispendeu cerca de 80 minutos em atividades alimentares (WDI: Figura 3), e cada evento de alimentação apresentou cerca de 24 minutos, a mais curta entre todos os percevejos avaliados em estruturas vegetativas (Figura 4). No entanto, de maneira semelhante a *E. meditabunda*, *D. melacanthus* repetiu os eventos de alimentação várias vezes, na média mais de três vezes por percevejo ($n = 21$) (Figura 2). Diferente das duas primeiras espécies, *P. guildinii*, embora também tenha ingerido líquidos dos vasos do xilema durante a sua alimentação na haste da planta de soja, repetiu os eventos de alimentação não mais que 1,2 vezes por percevejo ($n = 25$), totalizando um tempo médio de alimentação para cada inseto de 51 minutos, e com um tempo médio de duração de 40 minutos por evento (Figuras 2, 3 e 4).

Todos os percevejos avaliados se alimentaram em estruturas vegetativas (de soja ou milho) pelo menos uma vez durante as 8 horas de gravação. Em vagens de soja (endosperma

das sementes), *P. guildinii* alimentou-se por um longo período de tempo, cerca de 80 minutos por evento, no entanto, cada evento foi repetido apenas 0,5 vezes por percebejo (Figuras 2 e 4). Cerca de 50% dos insetos avaliados ($n = 17$) não se alimentaram do endosperma das sementes durante as 8 horas de gravação, portanto, considerando todos os percebejos avaliados, cada um gastou menos de 40 minutos se alimentando no endosperma da semente (Figura 3).

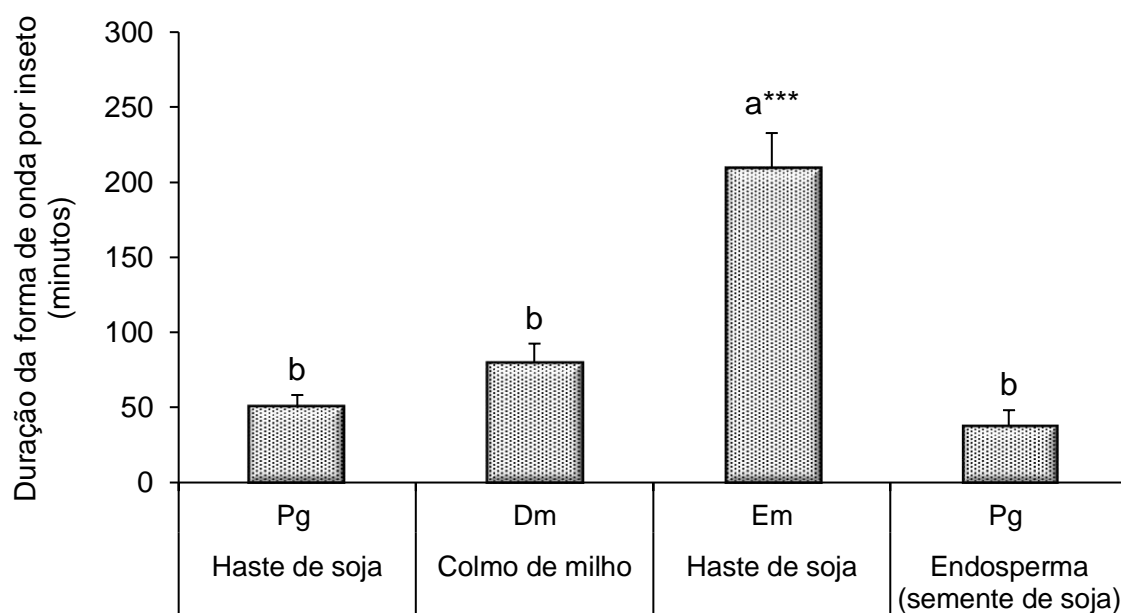


Figura 3 - Média (\pm EP) da duração das formas de onda relacionadas com alimentação por inseto (WDI) (minutos) registrado por meio da técnica de EPG durante as atividades alimentares de três espécies de pentatomídeos (Pg = *Piezodorus guildinii*; Dm = *Dichelops melacanthus*; e Em = *Edessa meditabunda*), em estrutura vegetativa (haste/colmo) e reprodutiva (semente) de diferentes plantas. *P. guildinii* alimentando-se em haste de soja ($n = 25$) e vagem de soja (endosperma da semente) ($n = 17$), *E. meditabunda* em haste de soja ($n = 25$), e *D. melacanthus* no colmo de plântulas de milho ($n = 21$). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$; testes de Kruskal-Wallis e Duncan). *** significativo a $P < 0,001$.

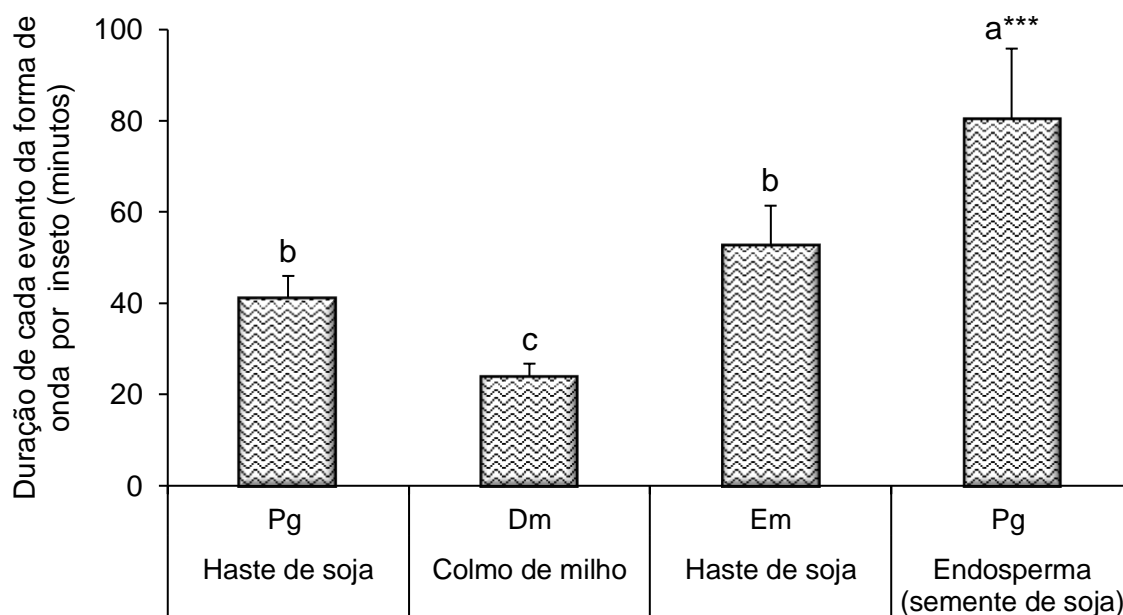


Figura 4 - Média (\pm EP) da duração dos eventos das formas de onda relacionadas com alimentação por inseto (WDEI) (minutos) registrado por meio da técnica de EPG durante as atividades alimentares de três espécies de pentatomídeos (Pg = *Piezodorus guildinii*; Dm = *Dichelops melacanthus*; e Em = *Edessa meditabunda*), em estrutura vegetativa (haste/colmo) e reprodutiva (semente) de diferentes plantas. *P. guildinii* alimentando-se em haste de soja (n = 25) e vagem de soja (endosperma da semente) (n = 17), *E. meditabunda* em haste de soja (n = 25), e *D. melacanthus* no colmo de plântulas de milho (n = 21). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$; testes de Kruskal-Wallis e Duncan). *** significativo a $P < 0,001$.

A comparação das gotas de fezes excretadas por *D. melacanthus* ao se alimentar em dois substratos diferentes, semente de soja túrgida e plântula de milho, mostrou diferenças estatísticas entre os substratos para a maioria das variáveis avaliadas. O número médio de gotas excretadas foi maior quando *D. melacanthus* alimentou-se em plântulas de milho (média de 9,9 gotas/percevejo) do que quando se alimentou em sementes de soja (1,4 gotas/percevejo) ($t = 3,34$; $P < 0,01$) (Figura 5). Neste último alimento, apenas quatro dos dez percevejos avaliados excretaram gotas de fezes, enquanto nas plântulas de milho todos os percevejos excretaram (Figuras 6A, B).

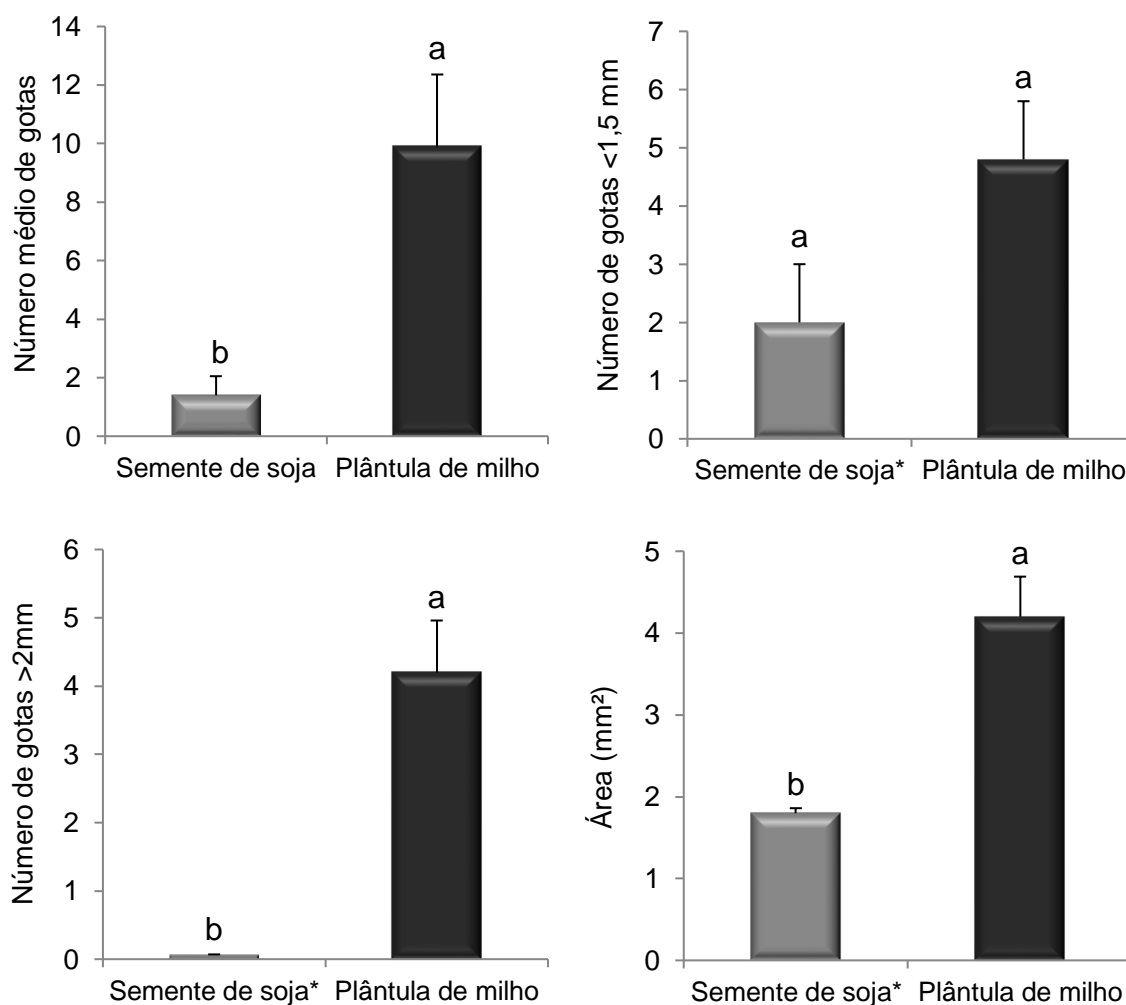


Figura 5 - Média (\pm EP) do número de gotas, número de gotas <1,5 mm, número de gotas >2,0 mm, e a área de gotas de fezes líquidas excretadas por *Dichelops melacanthus* ao se alimentar de sementes de soja túrgidas e plântulas de milho. Médias dentro de cada variável com a mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste *t* de student ($P < 0,05$; $n = 10$). *médias em sementes de soja foram calculadas considerando as gotas excretadas por quatro insetos, os demais não excretaram.

Para o número de gotas <1,5 mm, não houve diferenças estatísticas ($t = 1,51$; $P = 0,1619$) entre os tratamentos, no entanto, houve uma tendência de ser maior em plântulas de milho, a qual apresentou 4,8 gotas excretadas/percevejo, enquanto que semente de soja apresentou 2,0 gotas. O número de gotas >2,0 mm foi significativo ($t = 5,55$; $P < 0,001$), com plântulas de milho mostrando o valor mais elevado, média de 4,2 gotas/percevejo, enquanto que em sementes de soja não foram observadas gotas >2,0 mm. No que diz respeito à área de cada gota, também foram observadas diferenças estatísticas ($t = 4,80$; $P < 0,001$), no qual a

área média de cada gota foi maior em plântulas de milho ($4,2 \text{ mm}^2$) em comparação com as sementes de soja ($1,8 \text{ mm}^2$) (Figura 5).

Uma atividade peculiar e interessante foi observada quando *D. melacanthus* se alimentou em plântulas de milho. Nesse alimento, uma grande quantidade de saliva e/ou alimento líquido regurgitado foi expelido por todos os percevejos testados (Figuras 6A, C), ao passo que quando alimentados com sementes de soja, a quantidade de saliva e/ou alimento líquido expelido foi consideravelmente menor (Figuras 6B, D), além de que apenas 80% dos percevejos fizeram tal secreção nesse último alimento.

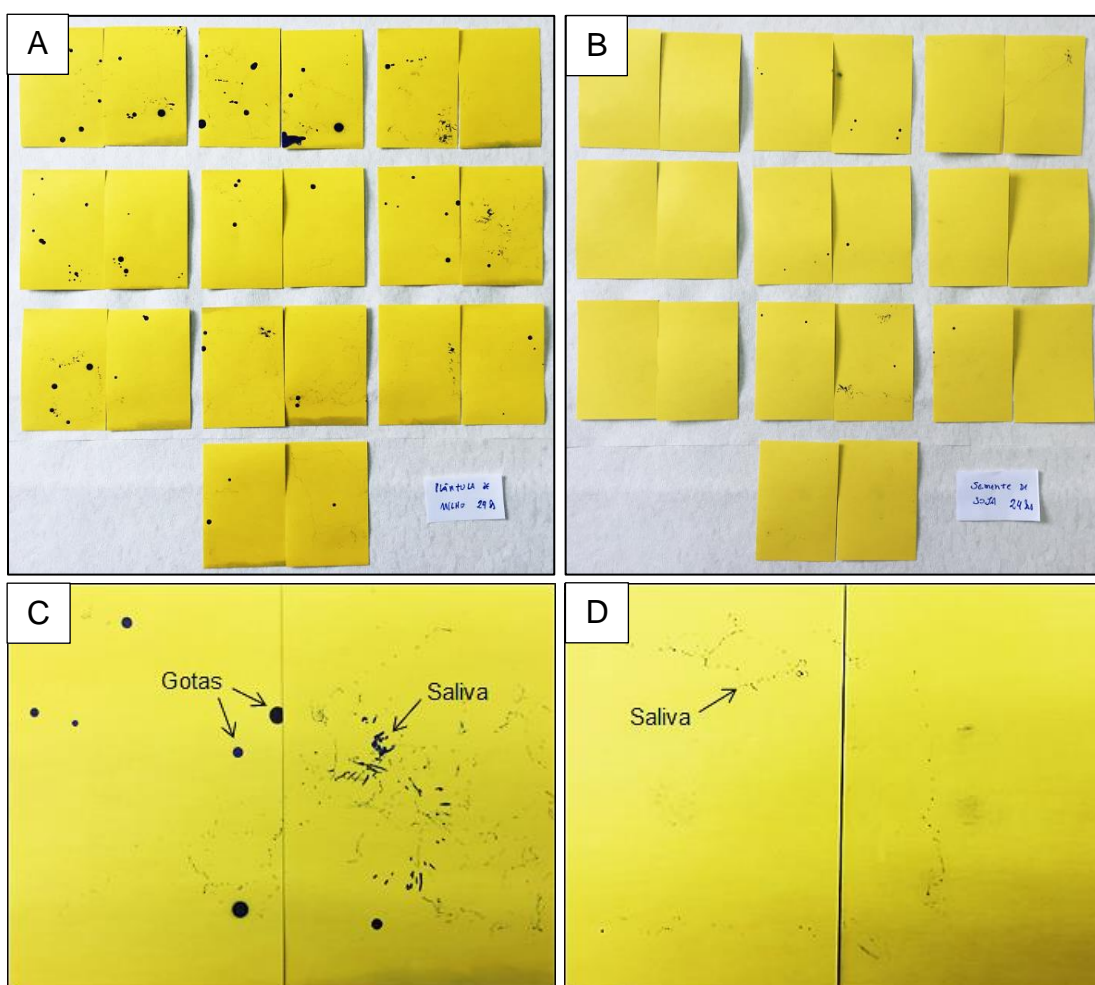


Figura 6 - Fezes excretadas (manchas redondas) e saliva e/ou alimento líquido regurgitado (marcas) expelidos no papel hidrosensível produzidos por adultos de *Dichelops melacanthus* ao se alimentarem de plântulas de milho (A, C) e de sementes de soja túrgidas (B, D).

7.4 Discussão

Os percevejos, em geral, são polípagos e exploraram uma gama enorme de plantas como fonte de alimento, tendo preferência em se alimentar de estruturas reprodutivas (frutas e sementes). No entanto, às vezes, estas estruturas não estão disponíveis no tempo e no espaço, e eles precisam mudar seu comportamento alimentar, passando de típicos sugadores de sementes para sugadores de estruturas vegetativas (folhas e hastes). Esses, são locais de alimentação menos preferidos pela maioria das espécies (PANIZZI, 2000, 2007; PANIZZI; SILVA, 2012).

P. guildinii e *D. melacanthus*, são relatados se alimentando em sementes de soja. A primeira espécie é considerada uma praga-chave nos campos de soja nas Américas (PANIZZI; SLANSKY, 1985). Já *D. melacanthus* é considerada praga secundária nessa cultura na Região Neotropical (SILVA et al., 2013). No entanto, *D. melacanthus* pode se alimentar de estruturas vegetativas de gramíneas, como trigo e milho. Nessas plantas, os insetos são encontrados alimentando-se de plântulas, e têm se tornado uma importante praga nestas culturas (CHOCOROSQUI; PANIZZI, 2004; MANFREDI-COIMBRA et al., 2005).

Sugadores de sementes têm uma enorme vantagem em comparação com insetos que se alimentam de estruturas vegetativas, pois as sementes são "pacotes" de nutrientes (SLANSKY; SCRIBER, 1985), estocados em células do endosperma (tecido de reserva da semente). Além disso, possuem baixo teor de água (cerca de 5 a 15% da sua massa). Em contrapartida, nas estruturas vegetativas, as células são muito menos concentradas em nutrientes, e possuem teores elevados de água (80 a 95%), a qual é transportada das raízes até as folhas pelas células do xilema (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Espécies de percevejos que têm preferência por se alimentar em estruturas vegetativas, em vez de estruturas reprodutivas, em geral, precisam fazer várias secções alimentares (chamadas eventos em pesquisas com EPG) e/ou realizar os eventos durante um tempo mais longo, devido à composição e a concentração de nutrientes da fonte alimentar. Por exemplo, na gravação do comportamento alimentar de *E. meditabunda* na haste da soja (local de alimentação preferido), cada percevejo repetiu os eventos de alimentação (ingestão de seiva do xilema e floema) em média de 4,2 vezes durante o período de gravação. Além disso, cada evento durou quase uma hora. Portanto, cada percevejo dispendeu, em média, 45% do seu tempo ingerindo seiva dos vasos do xilema e do floema.

Durante as gravações de EPG de *D. melacanthus* no colmo de plântulas de milho foi observado que cada evento de alimentação foi realizado durante um período de tempo menor

em comparação com *E. meditabunda*. No entanto, *D. melacanthus* mostrou um comportamento semelhante, ou seja, o percevejo ingeriu várias vezes (média de 3,3 vezes/percevejo) durante o período de gravação. Portanto, essa alta frequência alimentar provavelmente é responsável pelo maior número e tamanho das gotas de fezes excretadas por *D. melacanthus* observadas enquanto ele se alimentava do colmo de plântulas de milho.

P. guildinii também ingere líquidos dos vasos do xilema por um longo período de tempo (cerca de 40 minutos cada evento) ao se alimentar em haste da planta de soja. Porém, essa espécie, comparada com *E. meditabunda* e *D. melacanthus*, repetiu os eventos de alimentação apenas 1,2 vezes/percevejo. De acordo com Lucini et al. (2016), *P. guildinii* ingere seiva do xilema principalmente para evitar a desidratação, e para manter o equilíbrio hídrico e de nutrientes, uma vez que essa espécie tem preferência por se alimentar de sementes de soja (endosperma), que tem alta concentração de nutrientes (PANIZZII; SLANSKY, 1985). De acordo com Saxena (1963), sugadores de sementes, principalmente se alimentando de sementes secas, requerem uma grande quantidade de água durante suas atividades de alimentação, a qual é obtida pela alimentação em estruturas vegetativas.

Em resumo, a alimentação de *E. meditabunda* em haste de soja apresentou a mais longa duração (WDI), a qual foi causada pela combinação de vários eventos de alimentação (NWEI) com duração intermediária (WDEI). Em contraste, a alimentação de *P. guildinii* em ambos, haste e semente de soja, resultou em durações de alimentação curtas, causadas por um menor número de eventos de duração intermediária. *D. melacanthus* em colmo de milho também mostrou duração das atividades de alimentação curtas. No entanto, para esta espécie, este resultado foi causado por um elevado número de eventos de curta duração. Assim, a alta frequência de eventos alimentares pode causar uma duração de alimentação (WDI) curta ou elevada, dependendo da duração de cada evento.

Percevejos que se alimentaram de sementes excretaram gotas menores e em menor quantidade do que insetos que se alimentaram de estruturas vegetativas, provavelmente porque as sementes têm teor de água menor em comparação com tecidos vasculares (TAIZ; ZEIGER, 2004). De fato, foi observado que *D. melacanthus* que foram alimentados com sementes de soja, embora túrgidas, excretaram poucas e pequenas gotas de fezes. Além da baixa quantidade de água das sementes, os resultados obtidos estão provavelmente relacionados também com o método usado para obter os nutrientes das sementes, conhecidas como táticas de dilaceramento/maceramento da estratégia de ruptura celular (BACKUS et al., 2005). Esta estratégia é usada por *P. guildinii* ao se alimentar de sementes de soja (LUCINI et

al., 2016), e da mesma forma, *D. melacanthus* provavelmente utiliza esta estratégia neste alimento.

Nesta estratégia, o percevejo precisa degradar as células de reserva por meio da ação mecânica (dilaceramento) e química (maceração - atividade enzimática) para posteriormente ingerir o conteúdo celular degradado gerado por essas atividades. Apesar dos insetos se alimentarem por um longo período de tempo nas sementes, como observado em *P. guildinii* em sementes de soja (cerca de 80 minutos por evento), este tempo total não representa somente a ação de ingestão, pois a maior parte do tempo é gasto para preparar o tecido para futuramente ingerir (LUCINI et al., 2016). Enquanto que nos tecidos vasculares (xilema e floema) os nutrientes estão prontamente disponíveis para consumo.

O fato que 4 de 10 percevejos *D. melacanthus* mantidos nas arenas com sementes de soja túrgidas produziram gotas de fezes, pode indicar a ausência e/ou curtos eventos de alimentação sem excreção dos percevejos avaliados nesta fonte de alimento. Da mesma forma, apenas 50% dos adultos de *P. guildinii* alimentaram-se de sementes de soja no interior da vagem durante o período de gravação.

É interessante mencionar que a maior quantidade de líquido expelido pelos percevejos ao se alimentar em tecidos vegetativos comparado com a alimentação em sementes, pode incluir (além de saliva), a regurgitação ou egestão do excesso de líquidos ingeridos durante a alimentação. Nós notamos que os percevejos frequentemente moveram-se e arrastaram uma gota de saliva na ponta dos estiletes – ver linhas pontilhadas gravadas no papel hidrosensível nas figuras 6C, D. Essa atividade também foi observada em *Dichelops furcatus* (F.), alimentando-se em folhas de trigo (Figura 7) (PANIZZZI et al., 2015).



Figura 7 - Gota de saliva possivelmente contendo alimento líquido regurgitado (área circundada) posicionada na ponta dos estiletes de *Dichelops furcatus* após a alimentação em folhas de trigo. Fonte: Panizzi et al. (2015).

Em conclusão, os resultados demonstram que os percevejos em estruturas vegetativas se alimentaram com mais frequência, excretaram mais gotas fecais do que aqueles alimentados com o endosperma da semente, e expeliram mais saliva/ alimento líquido regurgitado. No entanto, os eventos de alimentação nas sementes levam mais tempo, provavelmente para "preparar" o alimento altamente concentrado para posterior ingestão dos nutrientes.

7.5 Referências

- ÁVILA, C. J.; PANIZZI, A. R. Occurrence and damage by *Dichelops* (*Neodichelops*) *melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) on corn. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 193-194, 1995.
- BACKUS, E. A.; BENNETT, W. H. The AC-DC Correlation Monitor: new EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing-sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 869-884, 2009.
- BACKUS, E. A.; SERRANO, M. S.; RANGER, C. M. Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior and physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 125-151, 2005.
- BACKUS, E. A.; CLINE, A. R.; ELLERSEICK, M. R.; SERRANO, M. S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 100, p. 296-310, 2007.
- CHOCOROSQUI, V. R.; PANIZZI, A. R. Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 487-492, 2004.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v. 11, p. 929-930, 1971.
- GALILEO, M. H. M.; HEINRICHS, E. A. Danos causados à soja em diferentes níveis e épocas de infestação durante o crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 14, p. 279-272, 1979.
- LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa meditabunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring pentatomids for EPG. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, p. 118-132, 2016.
- LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Feeding behavior of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) on maize seedlings: An EPG analysis of multiple input

impedances and histology correlation. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 110, *in press*, 2017.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R.; BACKUS, E. A. Characterization of an EPG waveform library for redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), on soybean plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 198-210, 2016.

MANFREDI-COIMBRA, S.; SILVA, J. J.; CHOCOROSQUI, V. R.; PANIZZI, A. R. Danos do percevejo barriga-verde *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) em trigo. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1243-1247, 2005.

PANIZZI, A. R. Suboptimal nutrition and feeding behavior of hemipterans on less preferred plant food sources. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 1-12, 2000.

PANIZZI, A. R. Nutritional ecology of plant feeding arthropods and IPM, pp. 170-222. In: KOGAN, M.; JEPSON, P. (Eds.). **Perspectives in ecological theory and integrated pest management**. Cambridge University Press, 590 p, 2007.

PANIZZI, A. R.; AGOSTINETTO, A.; LUCINI, T.; SMANIOTTO, L. S.; PEREIRA, P. R. V. S. **Manejo integrado dos percevejos barriga-verde, *Dichelops* spp. em trigo**. Embrapa Trigo, Série Documentos 114, 40 p, 2015.

PANIZZI, A. R.; SILVA, F. A. C. Insect bioecology and nutrition for integrated pest management (IPM), pp. 687-704. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. New York, CRC Press, 750 p, 2012.

PANIZZI, A. R.; SLANSKY JR, F. Legume host impact on performance of adult *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, v. 14, p. 237-242, 1985.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria, 2014.

RITCHIE, S.; HANWAY, J. J. **How a corn plant develops**. Iowa, Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, Ames (Special Report, 48), 21 p, 1989.

RIZZO, H. F. E. **Hemípteros de interés agrícola**. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 69 p, 1976.

SAXENA, K. N. Mode of ingestion in a heteropterous insect *Dysdercus koenigii* (F.) (Pyrrhocoridae). **Journal of Insect Physiology**, v. 9, p. 47-71, 1963.

SCHUH, R. T.; SLATER, J. A. **True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Classification and natural history**. Cornell University Press, Ithaca, 336 p, 1995.

SILVA, F. A. C.; SILVA, J. J.; DEPIERI, R. A.; PANIZZI, A. R. Feeding activity, salivary amylase activity and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa meditabunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 386-390, 2012.

SILVA, J. J.; VENTURA, M. U.; SILVA, F. A. C.; PANIZZII, A. R. Population dynamics of *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) on host plants. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 141-145, 2013.

SLANSKY JR, F.; PANIZZII, A. R. Nutritional ecology of seed-sucking insects, pp. 283-320. In: SLANSKY JR, F.; RODRIGUEZ, J. G. (Eds.). **Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. New York, J. Wiley & Sons, 1016 p, 1987.

SLANSKY JR, F.; SCRIBER, J. M. Food consumption and utilization, pp. 87-163. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Eds.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford, Pergamon, v. 4, 849 p, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates Inc., Publishers, Sunderland MA, 690 p, 2004

TJALLINGII, W. F. Electrical recording of stylet penetration activities, pp. 95-108. In: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Eds.). **World crop pests: Aphids, their biology, natural enemies and control**. Amsterdam, Elsevier, v. 2B, 382 p, 1988.

CAPÍTULO VIII

Monitoramento eletrônico das atividades alimentares do percevejo invasor *Bagrada hilaris* (Burmeister) (Hemiptera: Pentatomidae) em plantas de couve chinesa (*Brassica rapa* var. *pekinensis* (Lour.))

8.1 Introdução

O percevejo *Bagrada hilaris* (Burmeister) (Hemiptera: Pentatomidae), popularmente conhecido como percevejo pintado, é reportado para ocorrer na África e na Europa, e foi relatado pela primeira vez na América do Norte em Los Angeles, Califórnia em junho de 2008 (REED et al., 2013). Em seguida, disseminou-se para os estados do Arizona (PALUMBO; NATWICK, 2010), Nevada, Novo México, Utah e Texas (BUNDY et al., 2012; PERRING et al., 2013; REED et al., 2013), se tornando uma nova e importante praga para a agricultura, principalmente na região sudoeste dos EUA.

O percevejo pintado, embora seja considerado polífago, têm preferência por plantas da família Brassicaceae, conhecidas popularmente como crucíferas, como exemplos: brócolis, couve-flor, repolho, couve-chinesa, rabanete entre muitas outras (HUANG et al., 2014), nas quais seu ataque causa sérios danos. Além disso, têm potencial para infestar outras culturas agrícolas, incluindo: girassol (Asteraceae), algodão (Malvaceae), milho, sorgo, cana de açúcar e trigo (Poaceae) e plantas daninhas (REED et al., 2011).

Esse percevejo alimenta-se principalmente nas folhas jovens e nos meristemas apicais (PALUMBO; NATWICK, 2010), resultando em sérios danos causados pelas suas peças bucais (estiletes). O dano nas folhas pode resultar em murcha, seguido da dessecação dos tecidos e morte. Além disso, a alimentação nos meristemas apicais pode causar murcha dos pontos de crescimento e/ou deformação dos órgãos que irão ser formados (REED et al., 2013).

Como *B. hilaris* é uma espécie invasora nos EUA, informações sobre sua alimentação em plantas hospedeiras são limitadas. Portanto, nesse trabalho foi estudado o comportamento alimentar dessa espécie de percevejo em uma planta hospedeira do grupo das crucíferas, nesse caso a couve chinesa, por meio da técnica do gráfico de penetração elétrica (EPG). Esta técnica permite monitorar e medir as atividades dos estiletes de hemípteros internamente nos tecidos da planta, os quais são impossíveis de determinar visualmente. A

técnica de EPG tem sido aplicada principalmente para pequenos insetos sugadores, tais como, mosca-branca, afídeos, cigarrinhas e psilídeos (JANSSEN et al., 1989; PRADO; TJALLINGII, 1994; ALMEIDA; BACKUS, 2004; BONANI et al., 2010).

Para hemípteros maiores e mais robustos, como os percevejos, alguns estudos aplicando o EPG foram realizados, incluindo espécies nas famílias Coreidae (BONJOUR et al., 1991; COOK; NEAL, 1999), Miridae (CLINE; BACKUS, 2002; BACKUS et al., 2007, CERVANTES et al., 2016), Blissidae (BACKUS et al., 2013; RANGASAMY et al., 2015), e mais recentemente, em Pentatomidae (LUCINI; PANIZZI, 2016, 2017; LUCINI et al., 2016).

Neste trabalho caracterizamos e descrevemos as ondas elétricas relacionadas ao comportamento alimentar de *B. hilaris* enquanto se alimentava em folhas de couve chinesa por meio da técnica de EPG. Além disso, determinamos a provável estratégia alimentar que o percevejo emprega durante suas atividades, e quanto tempo ele gasta em cada uma dessas atividades alimentares. Estas informações básicas são essenciais para entender o dano potencial e desenvolver alternativas adequadas para o seu controle. Por fim, foi avaliado o efeito das mudanças elétricas do sistema de gravação no comportamento alimentar do percevejo.

8.2 Materiais e Métodos

8.2.1 Criação dos percevejos e obtenção das plantas

Colônias do percevejo *B. hilaris* (Figuras 1A, B) foram estabelecidas no laboratório de entomologia do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA - San Joaquin Valley Agricultural Sciences Center, Parlier, Califórnia. Os adultos foram coletados em plantas de couve-flor cultivadas no campo experimental da Universidade da Califórnia, levados ao laboratório e colocados em gaiolas de criação do tipo “bug dorms” (50 x 50 x 50 cm).

Plantas de brassicáceas comerciais incluindo brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck), couve chinesa (*B. rapa* var. *pekinensis* (Lour.), couve (*B. oleracea* var. *acephala* DC), e rabanete (*Raphanus sativus* var. *sativus* L.) foram fornecidos como alimento. As gaiolas foram mantidas em uma sala com temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa de $65 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 14:10 luz : escuro. Plantas foram checadas semanalmente, e substituídas quando necessário.

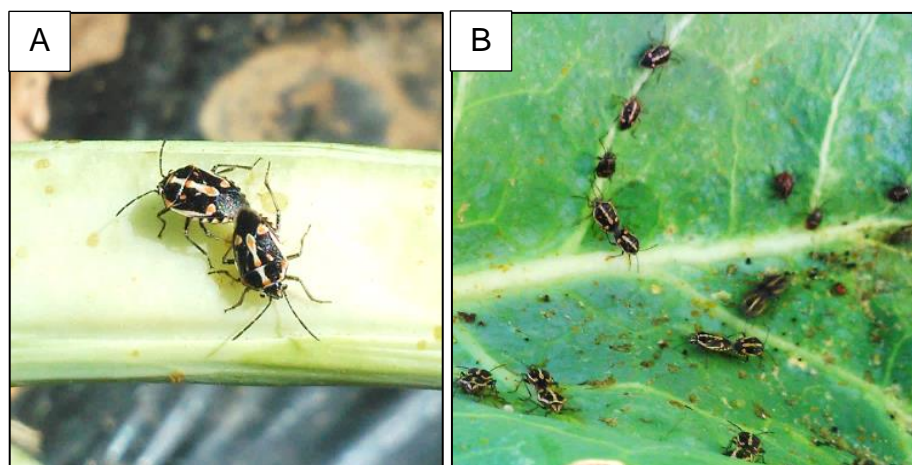


Figura 1 - Casal do percevejo pentatomídeo *Bagraha hilaris* coletado no campo experimental da Universidade da Califórnia (A). Colônia do percevejo em folhas de couve mantidas no laboratório (B).

Sementes dessas espécies de brassicas foram semeadas em bandejas plásticas de 50 células preenchidas com substrato comercial (Sun Gro Horticulture, Agawam, MA). Após 3-4 semanas, as mudas foram transplantadas em potes de plástico de 200 mL contendo o mesmo substrato comercial, e fertilizado com o produto comercial NPK 14-14-14 (Scotts-Sierra Horticultural Products Company, Marysville, OH). As plantas foram mantidas dentro de gaiolas “*bug dorms*” mantidas em casa de vegetação e com irrigação diária. Para gravar o comportamento alimentar do percevejo *B. hilaris*, usamos plantas de couve chinesa com 6-7 folhas desenvolvidas.

8.2.2 Conectando o percevejo no fio de ouro

Fêmeas do percevejo pintado foram separadas da colônia de laboratório e mantidas em frascos plásticos (50 ml). Em seguida, as mesmas foram anestesiadas individualmente com CO₂ durante ~5 segundos e imediatamente imobilizadas usando uma câmara de vácuo sob um estereomicroscópio (Leica MZ12.5, Leica Microsystems Ltda., Heerbrugg, Switzerland). Em seguida, os percevejos tiveram seu pronoto lixado para melhorar a fixação do fio de ouro ao seu corpo, de acordo com a metodologia proposta por Lucini e Panizzi (2016). Um fio de ouro (2-3 cm de comprimento e 0,006 mm de diâmetro) (Sigmund Cohn Corporation, Mount Vernon, New York, USA) foi soldado a um eletrodo de cobre de 2 cm de comprimento, que por sua vez foi soldado a um prego de cobre.

Na ponta do fio de ouro, um “*looping*” foi feito para expandir a superfície de contato do fio de ouro com o pronoto do percevejo. Uma gota de cola de prata condutora (água: flocos de prata [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA]: cola branca [Elmer’s GlueAll, Westerville, OH, USA]) (1: 1: 1; v: p: v), foi colocado no centro do pronoto lixado, e a ponta do fio com o *looping* foi mergulhado na cola e deixado para secar por alguns minutos.

8.2.3 Aquisição dos dados

Um monitor AC-DC de quatro canais (BACKUS; BENNETT, 2009; EPG Technologies, Inc., Gainesville, FL, USA) foi usado para gravar o comportamento alimentar dos percevejos durante ~18 h por dia, em condições de laboratório e de luz contínua. Plantas, insetos e os quatro amplificadores (canais) foram mantidos dentro de uma gaiola de Faraday. Uma das folhas da planta de couve chinesa foi selecionada e mantida com sua face abaxial voltada para cima sobre uma placa de vidro (20 cm de comprimento, 5 cm de largura) presa por meio de tiras de *Parafilm* (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI) (Figura 2).



Figura 2 - Detalhe da fêmea de *Bagrada hilaris* presa no fio de ouro e esse inserido no EPG *probe* (amplificador). Fêmea posicionada sobre a folha de couve chinesa presa por meio de tiras de parafilm e mantida com sua face abaxial voltada para cima.

A placa de vidro foi mantida horizontalmente por uma presilha de metal a qual estava presa a um suporte de metal (Van Sickle Electronics, St. Louis, MO). Depois disso, os percevejos conectados ao fio de ouro foram ligados individualmente a um amplificador e os

eletrodos da planta (fio de cobre de 3 cm de comprimento) foram inseridos no substrato contendo cada planta para fechar o circuito elétrico e permitir as gravações (Figura 2). Mudanças na tensão de saída durante as atividades dos estiletes do percevejo foram amplificadas, retificadas, e digitalizadas a uma taxa de 100 amostras por segundo por canal usando um DI-720 (Dataq® Instruments, Akron, OH, USA) e gravado com um computador de mesa Dell com software WinDaq Lite instalado (Dataq).

Tanto os sinais de pré e pós-retificação foram registrados simultaneamente em canais separados, e a calibragem “*offset*” foi mudada para igualar os dois sinais para que onda nativa (original) fosse retida por meio da retificação. As formas de onda foram caracterizadas considerando, amplitude, frequência, e origem elétrica, isto é, resistência (R), e força eletromotriz ou biopotencial (emf). As amplitudes mínima e máxima de cada forma de onda foram determinadas em comparação com a onda de maior amplitude em cada evento alimentar, considerando a diferença entre o vale com menor valor e o pico com o mais alto valor (fornecendo a amplitude relativa) (BACKUS et al., 2013).

8.2.4 Gravação das formas de onda e determinação da origem elétrica

No primeiro experimento foram caracterizadas as ondas elétricas, para isso, em cada canal (isto é, inseto) foi aplicado uma impedância de entrada diferente (R_i), sendo essas, 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 Ohms. Além disso, foi aplicada uma corrente alternada (AC) de 50 mV para todos os quatro canais. Retificação e ajustes de ganho foram regulados, quando necessário, para a ótima visualização das formas de onda (BACKUS; BENNETT, 2009). No segundo experimento, todos os quatro canais foram gravados aplicando uma R_i de 10^{13} Ohms com 0 mV de corrente AC. No terceiro experimento, foi aplicado 50 mV de corrente AC e todas as gravações dos percevejos começaram com um R_i de 10^7 Ohms e mudanças foram feitas para os níveis de R_i 10^8 , 10^9 e 10^{10} Ohms durante a ocorrência de uma forma de onda específica. O objetivo desses dois últimos experimentos, foi determinar o componente principal ou a origem elétrica de cada forma de onda, ou seja, componente R e/ou componente emf. No total, 44 percevejos foram registrados com êxito no primeiro experimento, 8 no segundo e 11 no terceiro.

8.2.5 Avaliação do efeito das mudanças elétricas no comportamento do percevejo

O experimento consistiu de quatro tratamentos conduzidos em esquema fatorial (2x2). Sendo, duas impedâncias de entrada (10^7 e 10^9 Ohms), dois tipos de sinais (AC e DC - corrente direta), e aplicação de 550 mV de voltagem. Dois canais (ou seja, insetos) foram gravados em 10^7 Ohms, e outros dois em 10^9 Ohms, aplicando sinal AC e DC. Retificação e ajustes de ganho foram regulados, quando necessário, para a ótima visualização das formas de onda (BACKUS; BENNETT, 2009). Neste caso, as atividades de alimentação foram registradas durante 7 horas por dia em condições de laboratório e luz contínua. No total, 40 percevejos foram registrados com sucesso (10 insetos por tratamento).

A duração de cada forma de onda descrita durante o comportamento alimentar do percevejo pintado, foi mensurada empregando o software Windaq/Pro + Waveform Browser, e baixada em arquivos de Microsoft Excel criados para estudos de EPG. Em seguida, os arquivos foram submetidos a avaliação por meio do programa Backus 2.0 (BACKUS et al., 2007; EBERT et al., 2015) desenvolvido para o programa estatístico SAS – *Statistical Analysis Software*. Foram consideradas as seguintes variáveis de resposta: TWD (Duração Total de cada Forma de onda), WDEI (Duração do Evento da Forma de onda por Inseto), WDI (Duração da Forma de onda por Inseto), NWEI (Número de Eventos da Forma de onda por Inseto) (BACKUS et al., 2007).

Essas variáveis foram comparadas entre os tipos de forma de onda, usando análise de variância (ANOVA; PROC GLIMMIX) (SAS INSTITUTE, 2013), e as comparações de pares subsequentes foram feitas com o teste de diferença mínima significativa (LSD), utilizando o LSMEANS (SAS INSTITUTE, 2013). As médias foram consideradas significativamente diferentes a $\alpha < 0,05$. Dados de duração e contagem foram transformados em $\log x$ e \sqrt{x} , respectivamente, antes da ANOVA.

8.3 Resultados

8.3.1 Caracterização das formas de onda

Durante o comportamento alimentar de *B. hiliaris* nas folhas de couve chinesa, em diferentes níveis de Ri, foram registrados quatro tipos diferentes de formas de onda, nomeados Np, Z, Bh1 e Bh2. Estas formas de onda foram descritas com base em sua aparência e características elétricas (frequência, amplitude relativa, e a origem elétrica - R

e/ou emf), as quais estão resumidas na Tabela 1. Seguindo outros estudos, nós dividimos as mesmas em ondas de não-alimentação (Z e Np) e ondas de alimentação (Bh1 e Bh2). A nomenclatura das ondas Z e Np foi estabelecida de acordo com Youn et al. (2011), e Bh1 e Bh2, empregou-se o formato com as iniciais Bh (de *Bagrada hilaris*) seguido por um número tal como aplicado em outros estudos com percevejos (LUCINI; PANIZZI, 2016, 2017; LUCINI et al., 2016). As duas ondas de alimentação foram agrupadas em uma única família, denominada I (ingestão) (Tabela 1).

Formas de onda de não alimentação (Np e Z). Estas ondas representam as atividades nas quais o percevejo não estava com os estiletes inseridos no tecido vegetal. Np foi observado quando o inseto estava andando na superfície da folha, apresentou alta amplitude relativa e frequência irregular, com vários picos. Estes sinais foram causados por contatos elétricos das garras tarsais ao arranhar a superfície da folha. Np foi semelhante em aparência quando gravada em todos os níveis de Ri, isso indica que essa onda apresenta uma mistura de componentes elétricos, R e emf. A forma de onda Z ocorreu quando o percevejo esteve parado sobre a superfície da folha, apresentou baixa amplitude com muito pouca variação no nível de voltagem, e representou a linha de base da gravação (Figuras 3A, 4A, B).

Fase de ingestão. Família I (Bh1 e Bh2). A forma de onda Bh1 representou o primeiro contato elétrico dos estiletes com o tecido vegetal, e ocorreu logo após a inserção dos mesmos no tecido da planta. Em todos os níveis de Ri aplicados (10^6 a 10^{13} Ohms), o nível de voltagem, de maneira geral, diminuiu repentinamente a partir da linha de base (forma de onda Z), i.e., o sinal da onda foi negativo (Figuras 3A, B; 4A, B). No entanto, em gravações com Ri de 10^{13} Ohms, foi também observado com frequência que o nível de voltagem aumentou rapidamente a partir da linha de base, i.e., o sinal da onda foi positivo. Essa mesma forma de onda (Bh1) foi observada também após eventos da onda Bh2 (representa atividades de ingestão, ver adiante), na seguinte sequência de eventos: Bh1 → Bh2 → Bh1. Neste caso, em todos os níveis de Ri, o nível de voltagem na transição entre Bh2 e Bh1 diminuiu gradualmente, e não de forma repentina (Figura 5A).

Tabela 1 - Sumário das formas de onda EPG AC-DC, suas principais características elétricas, e atividades biológicas propostas para cada forma de onda gravada durante o comportamento alimentar de *Bagrada hilaris* em folhas de couve chinesa.

Fase	Família	Tipo	Amplitude relativa (%)		Frequência (Hz)		Origem elétrica	Atividade biológica proposta
			Ri 10 ⁷	Ri 10 ⁹	Ri 10 ⁷	Ri 10 ⁹		
Não alimentação	-	Np	Alto	Alto	Irregular	Irregular	R/emf	Caminhando sobre a superfície da planta
	-	Z	Baixo	Baixo	Irregular	Irregular	-	Parado sobre a superfície da planta
Salivação	I	Bh1	100	100	Irregular + secções regulares 2,2 Hz (1,9 - 2,6)	Irregular + secções regulares 2,3 Hz (2,0 - 2,6)	Predominantemente R, mas também emf	Dilaceramento e maceramento enzimático dos tecidos foliares
Ingestão	I	Bh2	28 (17 -43)	56 (41 - 81)	5,0 Hz (4,0 - 6,5)	4,6 Hz (3,6 - 6,1)	Mistura: pico = R/emf; onda = emf	Ingestão do conteúdo celular degradado

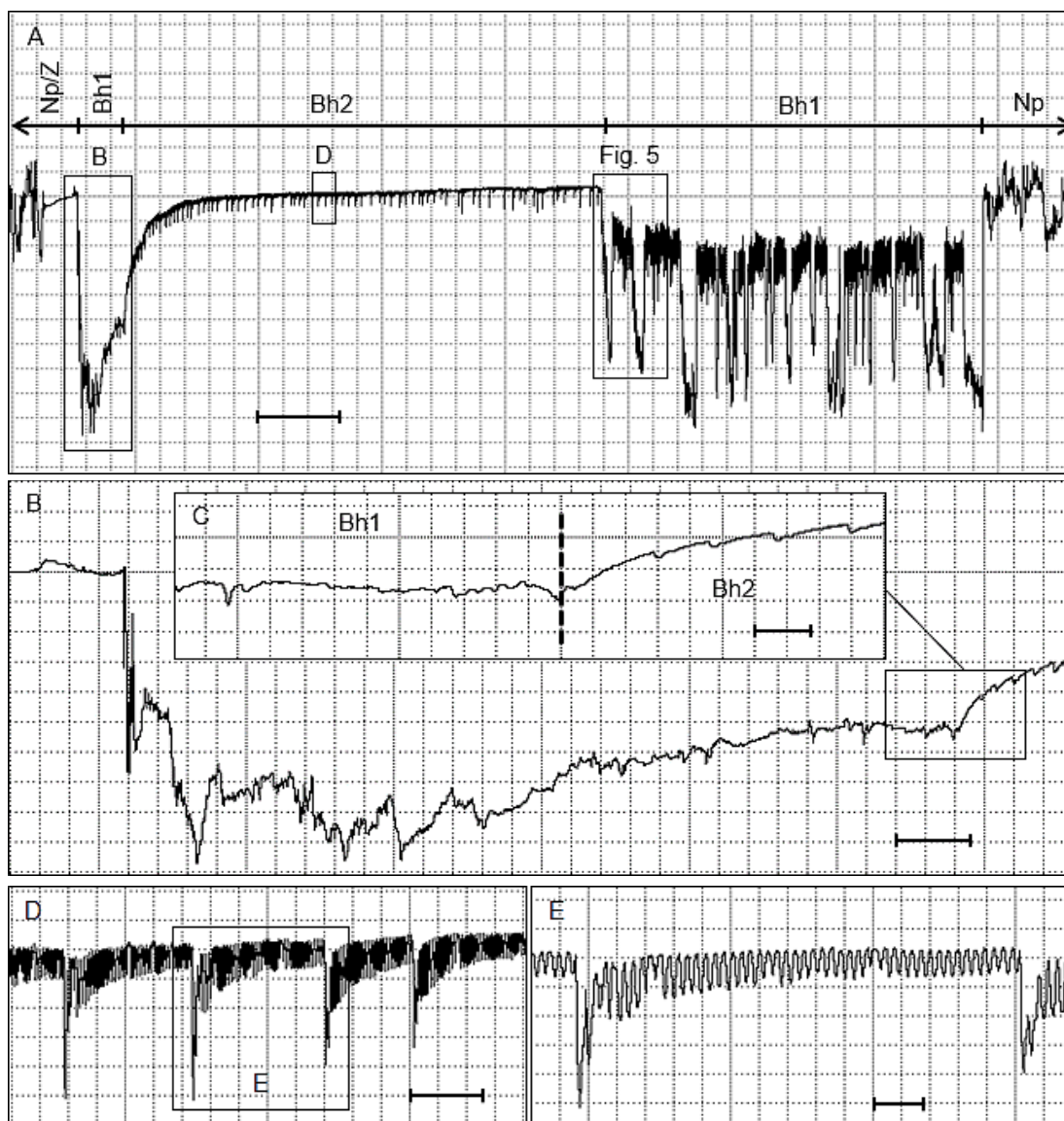


Figura 3 - Formas de onda gravadas durante as atividades alimentares do percevejo *Bgrada hilaris* em folhas de couve chinesa usando EPG AC-DC e aplicando um R_i de 10^7 Ohms. Visão geral de um evento alimentar (~22 min) mostrando as formas de onda Np e Z (não-alimentação) e as ondas Bh1 e Bh2 (alimentação) (A). Detalhe da forma de onda Bh1 e início da onda Bh2 (B, C). Detalhe da forma de onda Bh2 (D, E). Figura A tem Windaq compressão 150 [30 s/divisão vertical], ganho de 8x. B tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 8x. C tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 8x. D tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 64x. E tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 64x. Figura A = barra de escala equivale a 100s, figuras B, D = barra de escala equivale a 5s, figuras C, E = barra de escala equivale a 1s.

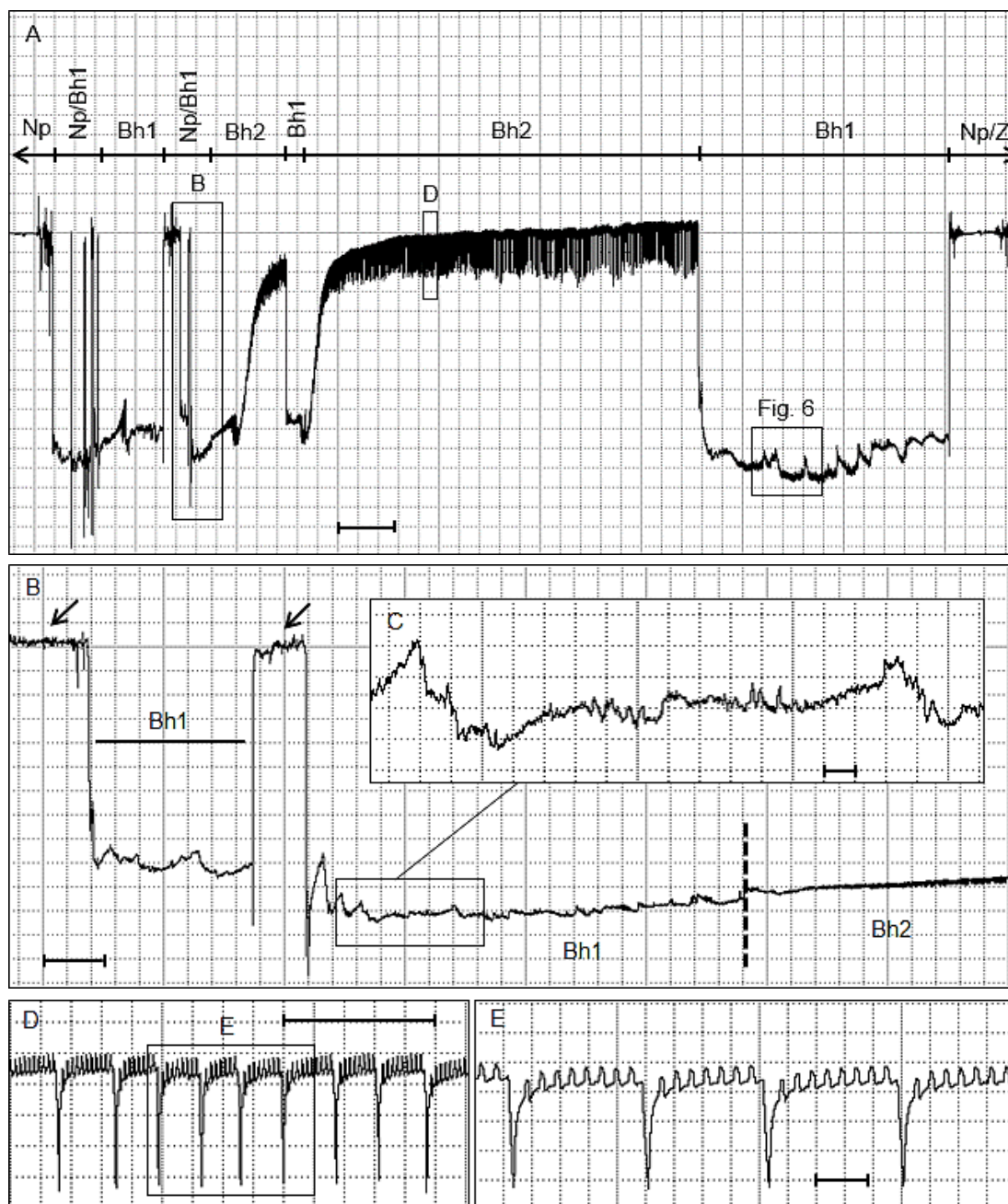


Figura 4 - Formas de onda gravadas durante as atividades alimentares do percevejo *Bagrada hilaris* em folhas de couve chinesa usando EPG AC-DC e aplicando um R_i de 10^9 Ohms. Visão geral de um evento alimentar (~58 min) mostrando as formas de onda Ne Z (não-alimentação), intercaladas com algumas ondas Bh1, e um evento de Bh2 (A). Detalhe da forma de onda Bh1 intercalada com eventos de não-alimentação (setas), e início da forma de onda Bh2 (B, C). Detalhe da forma de onda Bh2 (D, E). Figura A tem Windaq compressão 350 [70 s/divisão vertical], ganho de 8x. B tem compressão 20 [4 s/divisão vertical], ganho de 8x. C tem compressão 5 [1 s/divisão vertical], ganho de 32x. D tem compressão 10 [2 s/divisão vertical], ganho de 16x. E tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 16x. Figura A = barra de escala equivale a 200s, figuras B, D = barra de escala equivale a 10s, figuras C, E = barra de escala equivale a 1s.

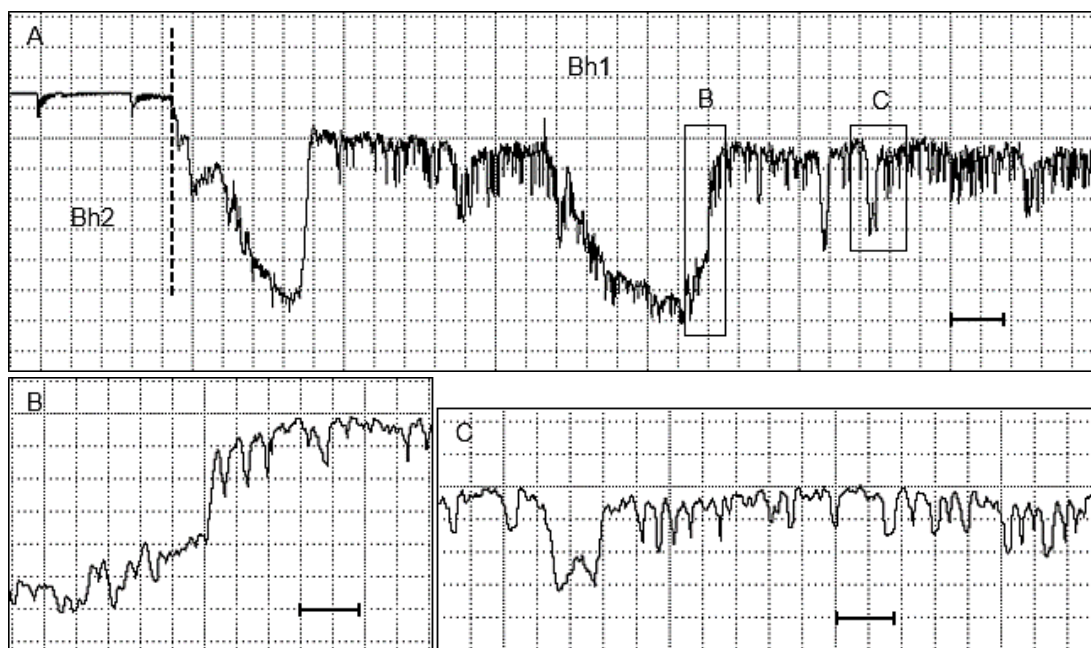


Figura 5 - Formas de onda gravadas durante as atividades alimentares do percevejo *Bagraha hilaris* em folhas de couve chinesa usando EPG AC-DC e aplicando um Ri de 10^7 Ohms. Período de transição entre a forma de onda Bh2 e início da onda Bh1 (A). Detalhes da forma de onda Bh1 (B, C). Figura A tem compressão 15 [3 s/divisão vertical], ganho de 8x. B, C tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 8x. Figura A = barra de escala equivale a 5s, figuras B, C = barra de escala equivale a 1s.

A onda Bh1 apresentou a maior amplitude relativa entre as duas ondas de alimentação e foi caracterizada por picos irregularmente distribuídos (Tabela 1, Figuras 3B, 4B, C). No entanto, muitas vezes a onda Bh1 gravada após a onda Bh2 mostrou um padrão estereotípico com picos frequentemente orientados para baixo e com certa regularidade (frequência de 2,2 e 2,3 Hz em 10^7 e 10^9 Ohms, respectivamente) (Tabela 1, Figuras 5A-C; 6A-C). Contudo, esses picos foram menos claros em gravações em 10^9 Ohms do que em 10^7 Ohms (comparação entre as figuras 5C e 6B).

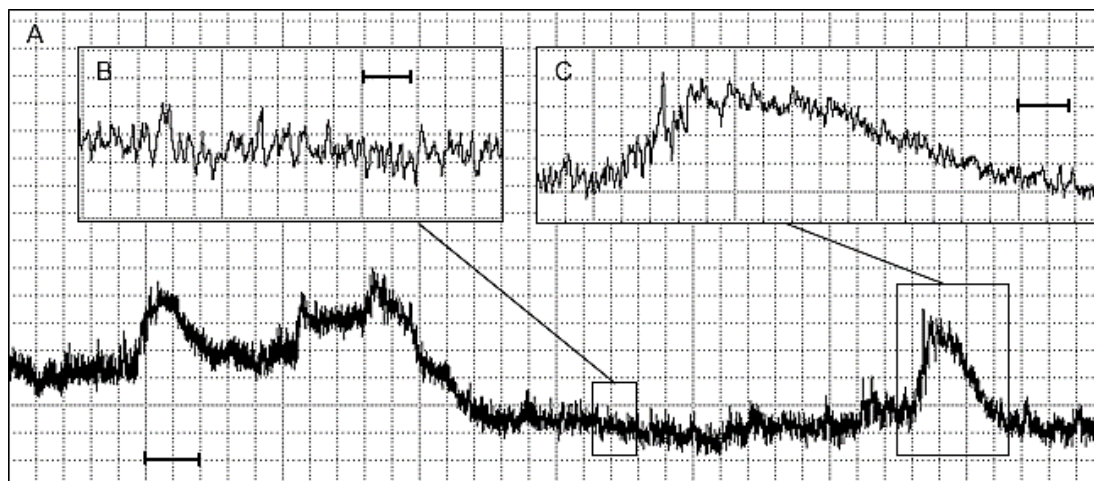


Figura 6 - Forma de onda Bh1 gravada após um evento da onda Bh2 durante as atividades alimentares do percevejo *Begrada hilaris* em folhas de couve chinesa usando EPG AC-DC e aplicando um Ri de 10^9 Ohms (A). Detalhes da forma de onda Bh1 (B, C). Figura A tem compressão 25 [5 s/divisão vertical], ganho de 32x. B tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 64x. C tem compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 32x. Figura A = barra de escala equivale a 10s, figuras B, C = barra de escala equivale a 1s.

Além do mais, Bh1 gravado após Bh2, mostrou uma série de episódios semelhante a um "grande pico" orientado negativamente ou positivamente de acordo com o nível de Ri aplicado. Em níveis baixos de Ri esses grandes picos foram negativos (Figuras 3A, 5A), enquanto que em altos níveis de Ri, esses inverteram sua orientação tornando-se positivos (Figuras 4A; 6A, C), sendo que essa inversão não se deve aos ajustes de retificação (*offset*) da onda (ver materiais e métodos). Este padrão Bh1 foi mais facilmente observado e distinguido em níveis baixos de Ri (10^6 a 10^8 Ohms) comparado com 10^9 Ohms ou acima disso. Além disso, em altos níveis de Ri ($> 10^9$ Ohms), a onda Bh1 apresentou um menor nível de amplitude quando comparado com níveis de Ri abaixo de 10^8 Ohms (Figuras 7 A-D). Esses resultados indicam que a origem elétrica da onda Bh1 é predominantemente composta pelo componente R, porém, Bh1 ainda foi claramente visível em altos níveis de Ri, logo o componente emf também está presente.

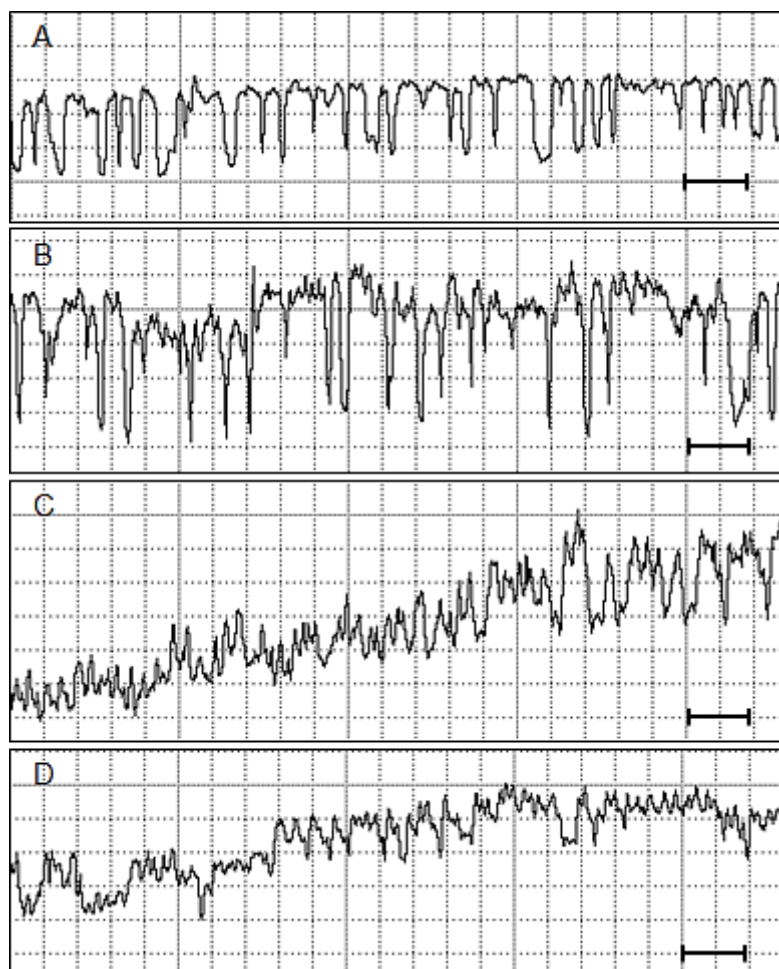


Figura 7 - Comparação da forma de onda Bh1 de *Bagrada hilaris* gravada em folhas de couve chinesa em quatro diferentes níveis de impedância de entrada (R_i), A = 10^7 , B = 10^8 , C = 10^9 , D = 10^{10} Ohms. Figuras A-D tem Windaq compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 16x. Figuras A-D = barra de escala equivale a 1s.

A forma de onda Bh2 foi registrada após Bh1, e foi possível observar um pequeno aumento do nível de voltagem durante o período de transição entre o final de Bh1 e início de Bh2 (Figuras 3B, C; 4B) em todos os níveis de R_i . Bh2 apresentou baixa a média amplitude relativa (média de 28%) e frequência regular (média de 5,0 Hz) em 10^7 Ohms, e de média a alta amplitude (média de 56%) e frequência regular (média de 4,6 Hz) em 10^9 Ohms (Tabela 1). Além do mais, Bh2 sempre foi composta por repetidos padrões de onda, intercalados com picos orientados para baixo (por vezes, estes picos eram para cima), os quais ocorreram em intervalos regulares ao longo de toda a forma de onda (Figuras 3D, E; 4D, E).

Em relação à origem elétrica (Figuras 8A-D), a forma de onda Bh2 apresentou uma mistura dos componentes elétricos, R e emf. Em baixos níveis de R_i (10^7 a 10^8 Ohms), os picos foram mais enfatizados do que as ondas. No entanto, as ondas ainda exibiram uma boa

aparência em 10^7 Ohms. Por outro lado, em 10^9 Ohms ou acima disso, as ondas e os picos foram fortemente realçados. Portanto, estas mudanças demonstram que o pico apresentou ambos os componentes elétricos, R e emf, ao passo que a onda foi principalmente dominada pelo componente emf.

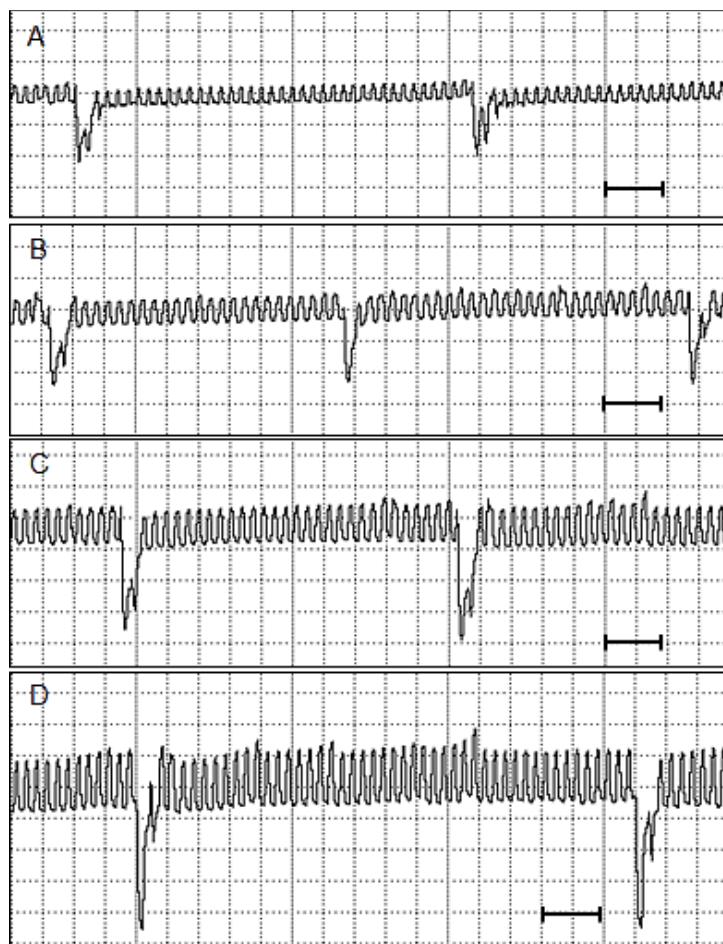


Figura 8 - Comparação da forma de onda Bh2 de *Bagrada hilaris* gravada em folhas de couve chinesa em quatro diferentes níveis de impedância de entrada (R_i), A = 10^7 , B = 10^8 , C = 10^9 , D = 10^{10} Ohms. Figuras A-D tem Windaq compressão 3 [0,6 s/divisão vertical], ganho de 16x. Figuras A-D = barra de escala equivale a 1s.

8.3.2 Avaliação do efeito das mudanças elétricas no comportamento do percevejo

Independentemente do sinal (AC e DC) ou do nível de R_i aplicado (10^7 e 10^9 Ohms), o percevejo *B. hilaris* passou a maior parte do tempo em eventos de não alimentação (ondas Np e Z), com cerca de 87% do tempo gravado, e apenas 13% em atividades de alimentação (ondas Bh1 e Bh2) (Figura 9).

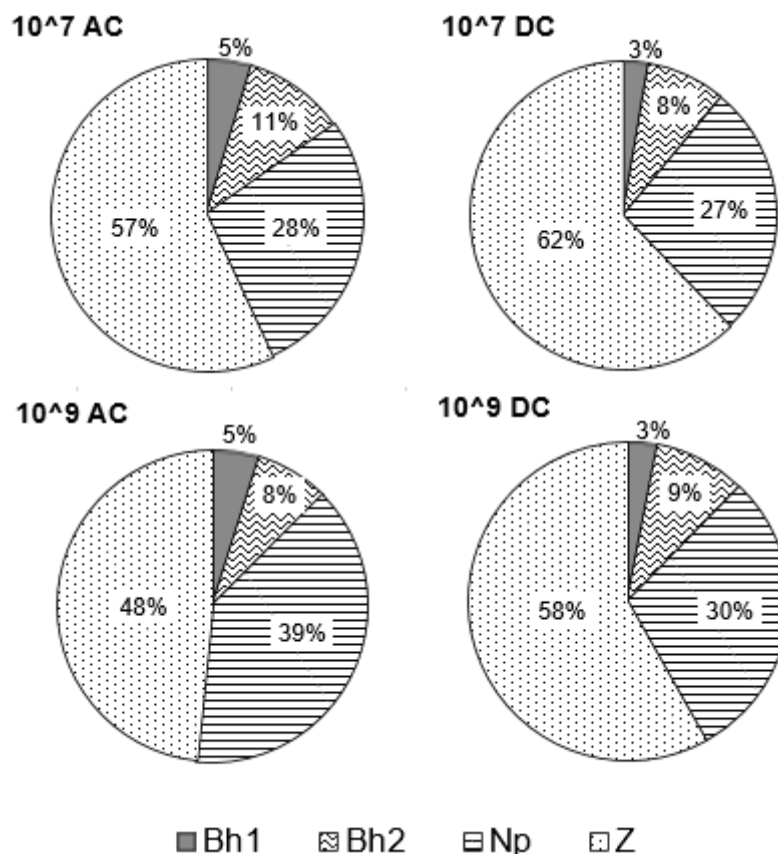


Figura 9 - Duração total de cada forma de onda (TWD) (em percentagem) registrada durante o comportamento alimentar de *Bagrada hilaris* em folhas de couve chinesa em diferentes tratamentos compostos por dois tipos de sinais (AC vs. DC), duas impedâncias de entrada (10^7 vs. 10^9 Ohms) e 550 mV de corrente elétrica no substrato.

Para forma de onda Z, na qual o inseto permanece parado, houve uma interação significativa entre o sinal e nível de Ri aplicados. Essa onda mostrou um número significativamente menor de eventos por inseto (NWEI) ($F = 4,68$; $P = 0,037$) quando foi aplicado um Ri de 10^9 Ohms e sinal DC (30 eventos) e Ri 10^7 AC (32 eventos) comparado com Ri 10^7 DC (44 eventos) (Tabela 2).

No entanto, a duração de cada evento de Z por inseto (WDEI) foi significativamente maior ($F = 6,17$; $P = 0,018$) quando aplicado Ri 10^9 DC (556 segundos), comparado com Ri 10^7 DC (366 segundos). Não foram observadas diferenças significativas na interação entre o sinal e o nível de Ri para a variável duração da onda Z por inseto (WDI) ($F = 0,75$; $P = 0,392$) (Tabela 2), e para todas as variáveis respostas quando avaliado apenas o sinal isoladamente (AC vs. DC) ou nível de Ri (10^7 vs. 10^9 Ohms) (dados não apresentados).

Tabela 2 - Médias (\pm EP) da duração (segundos) e número de eventos de variáveis respostas gravadas durante as atividades alimentares de *Bagrada hilaris* em folhas de couve chinesa usando EPG AC-DC. WDI = duração da forma de onda por inseto, WDEI = duração do evento da forma de onda por inseto, NWEI = número de eventos da forma de onda por inseto.

Forma de onda	Tratamento	WDI			WDEI			NWEI		
Z	10 ⁷ AC	14336,8 \pm 1071,5 a			474,8 \pm 47,9 ab			32,1 \pm 3,1 b		
	10 ⁷ DC	15280,2 \pm 979,7 a			365,9 \pm 33,0 b			44 \pm 3,9 a		
	10 ⁹ AC	12161,79 \pm 1137,3 a			396,8 \pm 58,5 ab			34,6 \pm 4,8 ab		
	10 ⁹ DC	14617,1 \pm 916,3 a			556,3 80,7 a			29,6 \pm 3,0 b		
		F	df	P	F	df	P	F	df	P
Ri vs. Sinal		0,75	36	0,392	6,17	36	0,018	4,68	36	0,037
Np	10 ⁷ AC	7039 \pm 934,3 a			209,1 \pm 42,7 a			38,0 \pm 3,9 ab		
	10 ⁷ DC	6750,2 \pm 1168,7 a			176,7 \pm 36,9 a			41,2 \pm 2,5 a		
	10 ⁹ AC	9818,0 \pm 980,6 a			267,1 \pm 46,9 a			41,7 \pm 4,7 a		
	10 ⁹ DC	7458,8 \pm 737,6 a			253,9 \pm 30,2 a			31,3 \pm 2,7 b		
	10 ⁷	6894,6 \pm 728,9 b			192,9 \pm 27,7 b			39,6 \pm 2,3 a		
	10 ⁹	8638,4 \pm 655,6 a			260,5 \pm 27,2 a			36,5 \pm 2,9 a		
		F	df	P	F	df	P	F	df	P
Efeito principal - Ri		4,42	36	0,043	5,09	36	0,030	1,01	36	0,321
Ri vs. Sinal		0,44	36	0,513	0,32	36	0,577	3,95	1,36	0,05

Continua ...

Forma de onda	Tratamento	WDI			WDEI			NWEI		
Bh1	10 ⁷ AC	1176 ± 211,2 a			84,7 ± 18,8 a			14,7 ± 1,5 a		
	10 ⁷ DC	671,5 ± 126,0 a			61,8 ± 7,1 a			11,3 ± 2,1 a		
	10 ⁹ AC	1210,5 ± 303,2 a			90,6 ± 20,5 a			13,0 ± 1,2 a		
	10 ⁹ DC	761,7 ± 205,2 a			83,9 ± 14,1 a			9,2 ± 1,7 a		
	AC	1193,2 ± 179,9 a			87,7 ± 13,6 a			13,9 ± 0,9 a		
	DC	716,8 ± 117,7 b			72,9 ± 8,1 a			10,3 ± 1,3 b		
		F	df	P	F	df	P	F	df	P
	Efeito principal - Sinal	5,47	36	0,025	0,29	36	0,592	6,6	36	0,015
Ri vs. Sinal		0,22	36	0,645	0,68	36	0,412	0,04	36	0,845
Bh2	10 ⁷ AC	2648,3 ± 163,5 a			709,8 ± 67,5 a			4,0 ± 0,4 a		
	10 ⁷ DC	2093,9 ± 379,3 a			643,5 ± 112,9 a			3,4 ± 0,5 a		
	10 ⁹ AC	1931,4 ± 183,7 a			569,0 ± 34,6 a			3,5 ± 0,4 a		
	10 ⁹ DC	2305,7 ± 442,4 a			855,9 ± 249,8 a			3,4 ± 0,5 a		
		F	df	P	F	df	P	F	df	P
Ri vs. Sinal		3,27	36	0,079	1,57	36	0,218	0,28	36	0,600

Médias para cada forma de onda seguida pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si à $\alpha < 0,05$ (teste LSD - Diferença Mínima Significativa).

A forma de onda Np, a qual representa o movimento do inseto na superfície da planta, mostrou diferenças significativas na interação (Sinal vs. Ri) apenas para a variável resposta NWEI ($F = 3,95$; $P = 0,05$). Sendo que novamente Ri 10^9 DC apresentou o menor número de eventos de Np por inseto (31 eventos) comparado com Ri 10^7 DC (41 eventos) e Ri 10^9 AC (42 eventos) os quais exibiram os maiores valores para essa variável. Além disso, a forma de onda Np mostrou diferenças significativas para as variáveis WDI ($F = 4,42$; $P = 0,043$) e WDEI ($F = 5,09$; $P = 0,030$) entre os níveis de Ri aplicados (10^7 vs. 10^9 Ohms). Nesse caso para ambas as variáveis, Ri 10^9 Ohms exibiu os valores mais elevados (WDI = 8638 segundos, WDEI = 261 segundos) (Tabela 2).

Em relação às formas de onda relacionadas à alimentação (Bh1 e Bh2), a onda Bh1 foi significativamente diferente quando avaliado o tipo de sinal aplicado (AC vs. DC) para as variáveis WDI ($F = 5,47$; $P = 0,025$) e NWEI ($F = 6,60$, $P = 0,015$). E ambos os casos, o sinal AC exibiu os maiores valores (WDI = 1193 segundos, NWEI = 14 eventos) (Tabela 2). Entretanto, não houve diferenças significativas para essa forma de onda na interação entre Ri e sinal aplicado, mas foi possível observar a tendência de aumento no número de eventos (NWEI) de Bh1 e na duração da onda Bh1 por inseto (WDI) quando aplicado o sinal AC, independentemente do nível de Ri aplicado.

Para a forma de onda Bh2, não foram observadas nenhuma diferença significativa entre os sinais, valores de Ri e interação entre esses para todas as variáveis avaliadas neste experimento. A única suposição é de que em Ri 10^9 DC, houve uma tendência de aumentar a duração de cada evento de Bh2 por inseto, ou seja, o WDEI (Tabela 2).

8.4 Discussão

O presente trabalho emprega a técnica de EPG utilizando o novo monitor de EPG AC-DC para avaliar o comportamento alimentar do percevejo pentatomídeo *B. hiliaris* em plantas de couve chinesa. Foram gravadas quatro diferentes formas de onda, sendo duas relacionadas as atividades de não-alimentação (Z e Np) e outras duas relacionadas as atividades de alimentação (Bh1 e Bh2).

Existem pelo menos duas diferentes estratégias que hemípteros podem usar durante suas atividades alimentares: 1) via bainha salivar e 2) via ruptura celular (BACKUS et al., 2005). No primeiro caso, saliva geleificante (saliva solidificante) é secretada pelo percevejo, enquanto seus estiletes estão penetrando no interior do tecido da planta em direção ao local de alimentação, que nesse caso são os vasos condutores. No segundo caso, a bainha salivar não é

completamente secretada, porque saliva aquosa é produzida ao invés de saliva geleificante. Além disso, o percevejo executa simultaneamente movimentos contínuos e rápidos dos seus estiletes no tecido vegetal. Assim, as células são dilaceradas pelo movimento dos estiletes (ação mecânica) e maceradas pela atividade enzimática de enzimas presentes na saliva aquosa (ação química). No final, o percevejo suga o conteúdo das células que foram dilaceradas e maceradas (MILES 1969, 1972).

Nós acreditamos que *B. hilaris* poderia estar utilizando a segunda estratégia de alimentação em plantas de couve chinesa, porque, durante a forma de onda de Bh1 os estiletes moveram-se para trás e para a frente no interior do tecido da planta, a qual foi observada principalmente na onda Bh1 gravada após a onda Bh2. Tal atividade é semelhante à observada na forma de onda Ia da cigarrinha *Empoasca fabae* (Harris) e *E. kraemeri* (Ross & Moore) (CALDERON; BACKUS, 1992), e com a forma de onda B do mirídeo *Lygus hesperus* Knight (CLINE; BACKUS, 2002). Além dessas, também com a forma de onda Dm3 do percevejo pentatomídeo *Dichelops melacanthus* (Dallas) (LUCINI; PANIZZU, 2016).

Todas estas formas de onda citadas representam a penetração dos estiletes e rompimento de múltiplas células da planta via ruptura celular, na qual o percevejo estaria preparando o local para a futura ingestão. O dano ocasionado pelas atividades de ruptura celular de *B. hilaris* em folhas de couve chinesa, podem ser vistas na figura 10. Além disso, a origem elétrica da forma de onda Bh1 foi predominantemente dominado por R, indicando a secreção de saliva aquosa, a qual é altamente condutiva.



Figura 10 - Danos em folha de couve chinesa (áreas circulares e esbranquiçadas) provocados pelo percevejo *Bagraa hilaris* durante suas atividades alimentares.

Durante as atividades de alimentação de *P. guildinii* na folha de soja, não foi observada o movimento dos estiletes para frente e para trás. Esse comportamento foi observado somente quando o percevejo se alimentou em vagens de soja (representado pela forma de onda Pg3a) que foi correlacionado com estiletes se movendo profundamente de maneira rápida e repetida no endosperma da semente (LUCINI et al., 2016).

Durante a forma de onda Bh2 os estiletes permaneceram imóveis no interior do tecido vegetal, e, provavelmente, representam a ingestão do conteúdo das células degradadas pela ruptura celular. Este comportamento é semelhante ao observado durante a forma de onda Ic de *E. fabae* e *E. Kraemeri* (CALDERON; BACKUS, 1992) e forma de onda C1 de *L. hesperus* (CLINE; BACKUS, 2002). Para *L. hesperus*, os autores observaram que a forma de onda C1 teve curta duração, o que indica que a ingestão não ocorreu em células de elementos crivados. Além disso, as formas de onda Ic e C1 mostraram-se como linhas sem muita variação na amplitude em Ri de 10^6 Ohms, sugerindo que um pouco ou nenhuma salivação ocorreu neste momento (CLINE; BACKUS, 2002).

Durante a ingestão de *B. hiliaris*, a forma de onda Bh2 não se apresentou como uma linha em 10^6 Ohms, além disso, apresentou picos muito claros e intercaladas com porções de onda, e essas foram muito planas. Além disso, quando se considera a origem elétrica, houve uma mistura de componentes R e emf, em que os picos foram uma mistura de R e emf, enquanto a porção das ondas foram predominantemente emf. Portanto, durante a forma de onda Bh2 pode estar acontecendo simultaneamente a salivação e a ingestão do conteúdo das células, representadas pelos picos e ondas, respectivamente.

No entanto, trabalhos publicados recentemente com pentatomídeos, empregando a técnica de EPG e também a análise histológica dos tecidos vegetais, tem demonstrando uma grande variação nas atividades alimentares dos percevejos avaliados, as quais poderiam estar ocorrendo em *B. hiliaris*. Isso porque, todos os percevejos pentatomídeos estudados apresentaram uma outra fase de alimentação, chamada inserção e penetração dos estiletes, a qual representa o movimento dos estiletes internamente no tecido vegetal e a secreção da bainha salivar (completa ou incompleta), a qual não foi descrita para *B. hiliaris*. Além do mais, a forma de onda Bh2 reportada para representar a ingestão do conteúdo celular previamente degradado pela ruptura de células, é muito similar em aparência e características elétricas com ondas correlacionadas, via histologia, com a ingestão de seiva dos vasos do xilema em outros pentatomídeos. Da mesma forma, a onda Bh1 gravada após a onda Bh2, a qual também é similar com outras ondas de dilaceramento/maceramento realizadas em tecidos vegetativos.

Portanto, estudos adicionais empregando análises histológicas dos tecidos vegetais ou vídeo correlação das ondas ou qualquer outra forma, devem ser feitos para definir com mais certeza o significado biológico das formas de onda de alimentação de *B. hiliaris*. Pois, apenas as características elétricas das ondas permitem supor quais atividades estariam sendo realizadas nessas formas de onda baseado em informações da literatura sobre o comportamento desse percevejo.

Entre as muitas aplicações fornecidas pelo novo monitor de EPG AC-DC, um deles é a possibilidade de estudar e esclarecer o efeito do tipo de sinal, nível de impedância, e da voltagem aplicado no sistema de EPG durante as atividades de alimentação e não-alimentação do inseto. Isto é importante, por exemplo, para definir, em qual impedância, sinal, voltagem ou a combinação desses fatores o inseto é mais perturbado, e tem o seu comportamento afetado. Nós desconhecemos qualquer artigo, utilizando o monitor EPG AC-DC, ou mesmo outro tipo de monitor, que estudou os efeitos de diferentes sinais elétricos, impedância de entrada, e níveis de voltagem no comportamento do inseto sugador.

Há apenas trabalhos desenvolvidos por exemplo para avaliar o efeito de hospedeiros resistentes e suscetíveis sobre o comportamento alimentar, como feito para *Blissus insularis* Barber (RANGASAMY et al., 2015). Também para avaliar o efeito do estresse hídrico da planta sobre o comportamento alimentar, tal como feito para a cigarrinha *Homalodisca vitripennis* (Germar) (KRUGNER; BACKUS, 2014), entre outros. Mas nada em relação ao efeito das características elétricas da gravação sobre o comportamento alimentar de insetos sugadores.

Nossos resultados de EPG mostraram que as diferenças mais importantes foram observadas durante as atividades não-alimentação, ou seja, quando o percevejo estava caminhando ou parado na superfície da planta. Ri de 10^9 Ohms e sinal DC parece ser a principal combinação para afetar o comportamento dessa espécie de percevejo durante suas atividades de não alimentação. Neste caso, os insetos apresentaram menor número de eventos (NWEI) de repouso (parado) e de movimentos do que em outros tratamentos, principalmente quando comparado com Ri 10^7 Ohms e sinal DC. No entanto, mesmo apresentando um reduzido número de eventos, esses tiveram uma longa duração. Assim, a principal diferença está no nível de impedância aplicada no sistema, nesse caso Ri 10^9 Ohms, na qual o percevejo passou muito tempo se movendo na superfície da planta. Isso indica, que com este nível de impedância, o percevejo fica mais agitado comparado com Ri 10^7 Ohms.

Com relação às atividades de alimentação, apenas a Bh1 mostrou diferenças entre os tratamentos quando comparado o tipo de sinal aplicado (AC vs. DC). O percevejo produziu a

onda Bh1 (NWEI) mais frequentemente e com maior duração (WDI) quando aplicado o sinal AC em relação ao sinal DC. A forma de onda Bh2 não mostrou nenhuma diferença entre os tratamentos, exceto com sinal DC e Ri 10⁹ Ohms, quando foi observada uma tendência, mas não significativa, para haver um aumento na duração do evento da onda (WDEI).

Em geral, leves diferenças foram observadas para as variáveis respostas avaliadas neste estudo, no qual foi aplicada uma alta voltagem (550 mV) associada com diferentes sinais e impedância de entrada. As diferenças mais importantes quanto ao número de eventos e no tempo de duração foram observadas enquanto o percevejo esteve nas atividades de não-alimentação (parado e caminhando na planta). Por outro lado, para as atividades alimentares (salivação e ingestão), quase nada foi significativamente diferente entre os tratamentos, apenas pode-se fazer inferências de prováveis efeitos das modificações elétricas nessas atividades. Portanto, o comportamento do percevejo *B. hiliaris* não foi severamente afetado quando utilizadas as configurações do EPG aplicadas neste estudo.

8.5 Referências

- ALMEIDA, R.; BACKUS, E. A. Stylet penetration behaviours of *Graphocephala atropunctata* (Say): EPG waveforms characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, p. 838-851, 2004.
- BACKUS, E. A.; BENNETT, W. H. The AC-DC Correlation Monitor: new EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing-sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 869-884, 2009.
- BACKUS, E. A.; CLINE, A. R.; ELLERSEICK, M. R.; SERRANO, M. S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 100, p. 296-310, 2007.
- BACKUS, E. A.; RANGASAMY, M.; STAMM, M.; MCAUSLANE, H. J.; CHERRY, R. Waveform library for chinch bugs (Hemiptera: Heteroptera: Blissidae): characterization of electrical penetration graph waveforms at multiple input impedances. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, p. 524-539, 2013.
- BACKUS, E. A.; SERRANO, M. S.; RANGER, C. M. Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior and physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 125-151, 2005.
- BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DAGLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, p. 35-49, 2010.

BONJOUR, E. L.; FARGO, W. S.; WEBSTER, J. A.; RICHARDSON, P. E.; BRUSEWITZ, G. H. Probing behavior comparisons of squash bugs (Heteroptera: Coreidae) on cucurbit hosts. **Environmental Entomology**, v. 20, p.143-149, 1991.

BUNDY, C. S.; GRASSWITZ, T. R.; SUTHERLAND, C. First report of the invasive stink bug *Bagrada hilaris* (Burmeister) (Heteroptera: Pentatomidae) from New Mexico, with notes on its biology. **Society of Southwestern Entomologists**, v. 37, p. 411-414, 2012.

CALDERON, J. D.; BACKUS, E. A. Comparison of the probing behaviors of *Empoasca fabae* and *E. kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) on resistant and susceptible cultivars of common beans. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 88-99, 1992.

CERVANTES, F. A.; BACKUS, E. A.; GODFREY, L.; AKBAR, W.; CLARK, T. L. Characterization of an EPG waveform library for adult *Lygus lineolaris* and *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton squares. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 684-697, 2016.

CLINE, A. R.; BACKUS, E. A. Correlations among AC electronic monitoring waveforms, body postures, and stylet penetration behaviors of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). **Environmental Entomology**, v. 31, p. 538-549, 2002.

COOK, C. A.; NEAL, J. J. Feeding behavior of larvae of *Anasa tristis* (Heteroptera: Coreidae) on pumpkin and cucumber. **Environmental Entomology**, v. 28, p. 173-177, 1999.

EBERT, T. A.; BACKUS, E. A.; CID, M.; FERERES, A. A new SAS program for behavioral analysis of electrical penetration graph data. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 116, p. 80-87, 2015.

HUANG, T.; REED, D. A.; PERRING, T. M.; PALUMBO, J. C. Host selection behavior of *Bagrada hilaris* (Hemiptera: Pentatomidae) on commercial cruciferous host plants. **Crop Protection**, v. 59, p. 7-13, 2014.

JANSSEN, J. A. M.; TJALLINGII, W. F.; VAN LENTEREN, J. C. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 52, p. 69-81, 1989.

KRUGNER, R.; BACKUS, E. A. Plant water stress effects on stylet probing behaviors of *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) associated with acquisition and inoculation of the bacterium *Xylella fastidiosa*. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 66-74, 2014.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa mediatubunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring pentatomids for EPG. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, p. 118-132, 2016.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Feeding behavior of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) on maize seedlings: An EPG analysis of multiple input

impedances and histology correlation. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 110, *in press*, 2017.

LUCINI, T.; PANIZZI, A. R.; BACKUS, E. A. Characterization of an EPG waveform library for redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), on soybean plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 198-210, 2016.

MILES, P. W. Interaction of plant phenols and salivary phenolases in the relationship between plants and Hemiptera. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 12, p. 736-744, 1969.

MILES, P. W. The saliva of Hemiptera. **Advances in Insect Physiology**, v. 9, p. 183-255, 1972.

PALUMBO, J. C.; NATWICK, E. T. The Bagrada bug (Hemiptera: Pentatomidae): A new invasive pest of cole crops in Arizona and California. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2010-0621-01-BR, 2010.

PERRING, T. M.; REED, D. A.; PALUMBO, J. C.; GRASSWITZ, T.; BUNDY, C. S.; JONES, W.; ROYER, T. United State Department of Agriculture – USDA, 2013. **National pest alert: bagrada bug *Bagrada hilaris* (Burmeister) Family Pentatomidae**. 2013. Disponível em: <<http://www.ncipmc.org/alerts/bagrabadbug.pdf>>. Acesso em: 10 jan 2016.

PRADO, E.; TJALLINGII, W. F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 72, p. 157-165, 1994.

RANGASAMY, M.; MCAUSLANE, H. J.; BACKUS, E. A.; CHERRY, R. H. Differential probing behavior of *Blissus insularis* (Hemiptera: Blissidae) on resistant and susceptible St. Augustine grasses. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, p. 780-788, 2015.

REED, D. A.; MAY, C.; LEWIS, T.; PERRING, T. M. **Effects of temperature and host plant on development, fecundity and longevity of the stink bug, *Bagrada hilaris***. 59th Annual Meeting of the Entomological Society of America, 13-16 November 2011, NV, 2011.

REED, D. A.; PALUMBO, J. C.; PERRING, T. M.; MAY, C. *Bagrada hilaris* (Hemiptera: Pentatomidae), an invasive stink bug attacking cole crops in the southwestern United States. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 4, p. C1-C7, 2013.

STATISTICAL ANALYSIS SOFTWARE – SAS (2013) **SAS/STA Tuser's guide**. SAS Institute Inc., Cary, NC.

YOUN, Y.; BACKUS, E. A.; SERIKAWA, R. H.; STELINSKI, L. L. Correlation of an electrical penetration graph waveform with walking by Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 94, p. 1084-1087, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES GERAIS

O emprego da técnica de EPG nesse trabalho nos permitiu investigar e desvendar muitas informações, até então incertas e desconhecidas, sobre as atividades alimentares de percevejos pentatomídeos em diferentes plantas hospedeiras. Nesse contexto, foi possível se determinar com precisão via estudos histológicos os diferentes locais que os estiletes dos percevejos exploraram no tecido vegetal durante formas de onda elétricas específicas e também por quanto tempo permanecerem em cada local.

Inicialmente tivemos que desenvolver um método para melhorar a fixação do filamento de fio de ouro ao corpo do percevejo, em virtude de seu tamanho corporal grande, força, comportamento (agitado), e presença de lipídios cuticulares. Esses fatores faziam com que a fixação do fio fosse constantemente comprometida durante o processo de gravação. Por isso, testamos algumas alternativas até desenvolver a “técnica da raspagem do pronoto” (local em que o eletrodo é fixado) usando uma lixa odontológica. Os resultados demonstraram que a remoção dos lipídios cuticulares via raspagem, melhorou em muito a efetividade da fixação do fio de ouro ao corpo do percevejo ao longo do tempo. Depois de desenvolver essa técnica, nós iniciamos o processo de gravação das atividades alimentares das diferentes espécies de percevejos pentatomídeos em diferentes plantas hospedeiras.

O percevejo *Edessa meditabunda* (F.), conhecido como percevejo asa-preta da soja, foi o primeiro percevejo pentatomídeo no mundo a ser estudado por meio da técnica de EPG, nesse caso em hastes de soja (local preferido para alimentação). Além desse, outras espécies estudadas foram *Piezodorus guildinii* (Westwood) em haste, folíolo e vagem de soja, *Dichelops melacanthus* (Dallas) em colmo de plântulas de milho, *Dichelops furcatus* (F.) em colmo e espiga de trigo, e *Bagrada hilaris* (Burmeister) em folhas de couve chinesa.

Durante suas atividades alimentares nas diferentes estruturas da planta, foram gravadas diversas formas de onda as quais representaram diferentes atividades. Com exceção, do percevejo *B. hilaris*, todos os demais se alimentaram dos vasos do xilema em suas respectivas estruturas vegetais avaliadas, a diferença entre eles foi o número de vezes e o tempo de cada secção (evento) alimentar. *E. meditabunda* apresentou o maior número de repetições e tempo de cada evento entre todos os percevejos avaliados, isso porque tem preferência por se alimentar de hastes. Além do mais, apenas esse percevejo se alimentou dos vasos do floema durante as atividades alimentares. Em todas as análises histológicas feitas durante as ondas que representaram a alimentação no xilema e no floema, foi observado que

todos os percevejos usaram a estratégia alimentar via bainha salivar com a secreção completa da mesma.

Por outro lado, uma outra estratégia de alimentação, conhecida como ruptura celular, foi empregada por todos os percevejos, exceto *E. meditabunda*, nos seus respectivos alimentos. Nesse caso, foi observado visualmente o movimento rápido e contínuo dos estiletes para dentro e para fora dos tecidos vegetais, no qual ocorria o dilaceramento (ação dos estiletes) e maceramento (ação química – enzimas digestivas) das células para posteriormente ingerir o conteúdo degradado por ambas as atividades. Essa estratégia foi relatada para os percevejos *P. guildinii* ao se alimentar da semente de soja (endosperma), em *D. melacanthus* em colmo de milho, *D. furcatus* em colmo e semente de trigo (endosperma), e *B. hilaris* em folhas de couve chinesa.

Mesmo que esses percevejos tenham empregado a mesma estratégia alimentar, as ondas foram diferentes em aparência e características elétricas em virtude do sítio alimentar. Por exemplo, *D. furcatus* empregou a ruptura celular tanto no colmo quanto na semente de trigo, e as ondas foram completamente diferentes em vários aspectos. Nas análises histológicas feitas durante as ondas que representaram a atividade de ruptura celular desses percevejos, foi observado que também houve a secreção da bainha salivar no tecido vegetal, contudo de forma incompleta. Além do mais, em cortes feitos no colmo de milho e trigo frescas, e no endosperma da semente de soja e de trigo imaturas foram observados danos visíveis nos tecidos vegetais, as quais foram causados pelas atividades de dilaceramento, maceramento e ingestão.

Por fim, os resultados obtidos aqui indicam que a bainha salivar está sempre presente, a diferença é que essa pode ser completa ou incompleta, dependendo da estratégia alimentar utilizada pelo percevejo. Além disso, uma mesma espécie de percevejo pode empregar uma ou mais estratégias de alimentação mudando de acordo com suas atividades alimentares, e o que define qual será empregada é o sítio alimentar explorado. Essa mudança de estratégia alimentar nunca havia sido documentada via estudos com EPG em percevejos, logo, isso será útil para o entendimento das causas dos danos e o desenvolvimento de tecnologias para melhorar o controle de percevejos pragas em estudos futuros.

REFERÊNCIAS DA TESE

- ALMEIDA, R.; BACKUS, E. A. Stylet penetration behaviours of *Graphocephala atropunctata* (Say): EPG waveforms characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, p. 838-851, 2004.
- ALVAREZ, A. E.; TJALLINGII, W. F.; GARZO, E.; VLEESHOUWERS, V.; DICKE, M.; VOSMAN, B. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 121, p. 145-157, 2006.
- ÁVILA, C. J.; PANIZZI, A. R. Occurrence and damage by *Dichelops* (*Neodichelops*) *melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) on corn. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 193-194, 1995.
- BACKUS, E. A. History, development, and applications of the AC electronic monitoring system for insect feeding, pp. 1-51. In: ELLSBURY, M. M.; BACKUS, E. A.; ULLMAN, D. L. (Eds.). **History, development, and application of AC electronic insect feeding Monitors**. Entomological Society of America, Lanham, MD, 128 p, 1994.
- BACKUS, E. A.; ANDREWS, K. B.; SHUGART, H. J.; GREVE, L. C.; LABAVITCH, J. M.; ALHADDAD, H. Salivary enzymes are injected into xylem by the glassy-winged sharpshooter, a vector of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 949-959, 2012.
- BACKUS, E. A.; BENNETT, W. H. The AC-DC Correlation Monitor: New EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing-sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 869-884, 2009.
- BACKUS, E. A.; CLINE, A. R.; ELLERSEICK, M. R.; SERRANO, M. S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 100, p. 296-310, 2007.
- BACKUS, E. A.; HABIBI, J.; YAN, F.; ELLERSIECK, M. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implications for transmission of *Xylella fastidiosa*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, p. 787-813, 2005a.
- BACKUS, E. A.; HOLMES, W. J.; SCHREIBER, F.; REARDON, B. J.; WALKER, G. P. Sharpshooter X wave: Correlation of an electrical penetration graph waveform with xylem penetration supports a hypothesized mechanism for *Xylella fastidiosa* inoculation. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, p. 847-867, 2009.
- BACKUS, E. A.; RANGASAMY, M.; STAMM, M.; MCAUSLANE, H. J.; CHERRY, R. Waveform library for chinch bugs (Hemiptera: Heteroptera: Blissidae): characterization of electrical penetration graph waveforms at multiple input impedances. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, p. 524-539, 2013.
- BACKUS, E. A.; SERRANO, M. S.; RANGER, C. M. Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior and physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 125-151, 2005b.
- BAUR, M. E.; BALDWIN, J. Red banded stink bug trouble in Louisiana. **Louisiana Agriculture**, v. 49, p. 9-10, 2006.
- BOITEAU, G.; COLPITTS, B. Electronic tags for the tracking of insects in flight: effect of weight on flight performance of adult Colorado potato beetles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 100, p. 187-193, 2001.
- BOITEAU, G.; MELOCHE, F.; VINCENT, C.; LESKEY, T. C. Effectiveness of glues used for harmonic radar tag attachment and impact on survival and behavior of three insect pests. **Environmental Entomology**, v. 38, p. 168-175, 2009.
- BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, p. 35-49, 2010.
- BONJOUR, E. L.; FARGO, W. S.; WEBSTER, J. A.; RICHARDSON, P. E.; BRUSEWITZ, G. H. Probing behavior comparisons of squash bugs (Heteroptera: Coreidae) on cucurbit hosts. **Environmental Entomology**, v. 20, p. 143-149, 1991.
- BOWLING, C. C. The stylet sheath as an indicator of feeding activity of the rice stink bug. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, p. 259-260, 1979.
- BUNDY, C. S.; GRASSWITZ, T. R.; SUTHERLAND, C. First report of the invasive stink bug *Bagrada hilaris* (Burmeister) (Heteroptera: Pentatomidae) from New Mexico, with notes on its biology. **Society of Southwestern Entomologists**, v. 37, p. 411-414, 2012.
- BUNTIN, G. D.; GREENE, J. K. Abundance and species composition of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) in Georgia winter wheat. **Journal of Entomological Science**, v. 39, p. 287-290, 2004.
- CAI, X.; WU, K.; YUAN, G.; CAI, X. M.; WU, K. M.; YUAN, G. H. Electrical penetration graphs of *Adelphocoris suturalis* Jakovlev in main host crops. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 41, p. 431-436, 2008.
- CALATAYUD, P. A.; SELIGMANN, C. D.; POLANIA, M. A.; BELLOTTI, A. C. Influence of parasitism by encyrtid parasitoids on the feeding behaviour of the cassava mealybug *Phenacoccus herreni*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 98, p. 271-278, 2001.
- CALDERON, J. D.; BACKUS, E. A. Comparison of the probing behaviors of *Empoasca fabae* and *E. kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) on resistant and susceptible cultivars of common beans. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 88-99, 1992.
- CAMPOS, L. A.; GRAZIA, J. Análise cladística e biogeografia de Ochlerini (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae). **Iheringia**, v. 96, p. 147-163, 2006.
- CAO, H. H.; ZHANG, M.; ZHAO, H.; ZHANG, Y.; WANG, X. X.; GUO, S. S.; ZHANG, Z. F.; LIU, T. X. Deciphering the mechanism of β -aminobutyric acid-induced resistance in wheat to the grain aphid, *Sitobion avenae*. **PLoS ONE**, v. 9: e91768. doi 10.1371/journal.pone.0091768, 2014.

- CARPANE, P.; WAYADANDE, A.; BACKUS, E.; DOLEZAL, W.; FLETCHER, J. Characterization and correlation of new electrical penetration graph waveforms for the corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, p. 515-525, 2011.
- CEN, Y.; YANG, C.; HOLFORD, P.; BEATTIE, G. A. C.; SPOONER-HART, R. N.; LIANG, G.; DENG, X. Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 143, p. 13-22, 2012.
- CERVANTES, F. A.; BACKUS, E. A.; GODFREY, L.; AKBAR, W.; CLARK, T. L. Characterization of an EPG waveform library for adult *Lygus lineolaris* and *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton squares. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 684-697, 2016.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 4 ed. Cambridge University Press, 788 p, 1998.
- CHIARADIA, L. A.; REBONATTO, A.; SMANIOTTO, M. A.; DAVILA, M. R. F.; NESI, C. N. Arthropods associated with soybean crops. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, p. 29-36, 2011.
- CHOCOROSQUI, V. R.; PANIZZI, A. R. Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 487-492, 2004.
- CID, M.; FERERES, F. Characterization of the probing and feeding behavior of *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) on grapevine. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, p. 404-417, 2010.
- CIVOLANI, S.; CASSANELLI, S.; CHICCA, M.; RISON, J. L.; BASSI, A.; ALVAREZ, J. M.; ANNA, I. B.; PARRELLA, G.; GIORGINI, M.; FANO, E. A. An EPG study of the probing behavior of adult *Bemisia tabaci* Biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) following exposure to cyantraniliprole. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 910-919, 2014.
- CIVOLANI, S.; LEIS, M.; GRANDI, G.; GARZO, E.; PASQUALINI, E.; MUSACCHI, S.; CHICCA, M.; CASTALDELLI, G.; ROSSI, R.; TJALLINGII, W. F. Stylet penetration of *Cacopsylla pyri*: an electrical penetration graph (EPG) study. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 1407-1419, 2011.
- CLINE, A. R.; BACKUS, E. A. Correlations among AC electronic monitoring waveforms, body postures, and stylet penetration behaviors of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). **Environmental Entomology**, v. 31, p. 538-549, 2002.
- COOK, C. A.; NEAL, J. J. Feeding behavior of larvae of *Anasa tristis* (Heteroptera: Coreidae) on pumpkin and cucumber. **Environmental Entomology**, v. 28, p. 173-177, 1999.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; AZEVEDO, J. Soybean seed damage by different species of stink bugs. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, p. 145-150, 2002.
- DEPIERI, R. A.; PANIZZI, A. R. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, p. 197-203, 2011.
- DIAZ-MONTANO, J.; REESE, J. C.; LOUIS, J.; CAMPBELL, L. R.; SCHAPAUGH, W. T. Feeding behavior by the soybean aphid (Hemiptera: Aphididae) on resistant and susceptible soybean genotypes. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, p. 984-989, 2007.
- DUGRAVOT, S.; BACKUS, E. A.; REARDON, B. J.; MILLER, T. A. Correlations of cibarial muscle activities of *Homalodisca* spp. sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) with EPG ingestion waveform and excretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 1467-1478, 2008.
- EBERT, T. A.; BACKUS, E. A.; CID, M.; FERERES, A. A new SAS program for behavioral analysis of electrical penetration graph data. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 116, p. 80-87, 2015.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, v. 11, p. 929-930, 1971.
- FERREIRA, E.; SILVEIRA, P. M. Dano de *Thyanta perditor* (Hemiptera: Pentatomidae) em trigo (*Triticum aestivum* L.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 20, p. 165-171, 1991.
- FROTA, R. T.; SANTOS, R. S. S. Pentatomidae bugs associated with sunflower crops in the northwest of Rio Grande do Sul state and the action of *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae) on sunflower seeds. **Biotemas**, v. 20, p. 65-71, 2007.
- GALILEO, M. H. M.; GASTAL, H. A. O.; GRAZIA, J. Levantamento populacional de Pentatomidae (Hemiptera) em cultura de soja (*Glycine max* L. Merr.) no município de Guaíba, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 37, p. 111-120, 1977.
- GALILEO, M. H. M.; HEINRICHS, E. A. Danos causados à soja em diferentes níveis e épocas de infestação durante o crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 14, p. 279-272, 1979.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, FEALQ, 920 p, 2002.
- GHAFFAR, M. B. A.; PRITCHARD, J.; FORD-LLOYD, B. Brown planthopper (*N. lugens* stal) feeding behaviour on rice germplasm as an indicator of resistance. **PLoS ONE**, v. 6: e22137. doi:10.1371/journal.pone.0022137, 2011.
- GRAZIA, J. Revisão do gênero *Dichelops* Spinola, 1837 (Heteroptera, Pentatomidae, Pentatomini). **Iheringia Série Zoologia**, v. 53, p. 3-119, 1978.
- GRAZIA, J.; CAVICHIOLI, R. R.; WOLFF, V. R. S.; FERNANDES, J. A. M.; TAKIYA, D. M. Hemiptera, pp. 347-406. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, A. S.; CONSTANTINO, R. (Eds.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto, Holos Editora, 810 p, 2012.

- GRAZIA, J.; PANIZZI, A. R.; GREVE, C.; SCHWERTNER, F.; CAMPOS, L. A.; GARBELOTTO, T. A.; FERNANDES, J. A. M. Stink Bugs (Pentatomidae), pp. 681-756. In: Panizzi, A. R., Grazia, J. (Eds.) **True bugs (Heteroptera) of the neotropics**. Dordrecht, Springer, 901 p, 2015.
- GREENE, J. K.; TURNIPSEED, S. G.; SULLIVAN, M. J.; MAY, O. L. Treatment thresholds for stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in cotton **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 403-409, 2001.
- HARREWIJN, P.; KAYSER, H. Pymetrozine, a fast-acting and selective inhibitor of aphid feeding. *In-situ* studies with electronic monitoring of feeding behaviour. **Pesticide Science**, v. 49, p. 130-140, 1997.
- HE, Y.; ZHANG, J.; CHEN, J.; WU, Q.; CHEN, L.; CHEN, L.; XIAO, P.; ZHU, Y. C. Influence of pymetrozine on feeding behaviors of three rice planthoppers and a rice leafhopper using electrical penetration graphs. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, p. 1877-1884, 2011a.
- HE, Y.; CHEN, J.; ZHANG, J.; CHEN, L.; SHEN, J.; ZHU, Y. C. Penetration graphic evidence that pymetrozine toxicity to rice brown planthopper is by inhibition of phloem feeding. **Pest Management Science**, v. 67, p. 483-491, 2011b.
- HORI, K. Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera, pp. 11-36. In: SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R. (Eds.). **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton, CRC Press, 856 p, 2000.
- HUANG, T.; REED, D. A.; PERRING, T. M.; PALUMBO, J. C. Host selection behavior of *Bagrada hilaris* (Hemiptera: Pentatomidae) on commercial cruciferous host plants. **Crop Protection**, v. 59, p. 7-13, 2014.
- JANSSEN, J. A. M.; TJALLINGII, W. F.; VAN LENTEREN, J. C. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 52, p. 69-81, 1989.
- JIANG, Y. X.; LEI, H.; COLLAR, J. L.; MARTÍN, B.; MUÑIZ, M.; FERERES, A. Probing and feeding behavior of two distinct biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 357-366, 1999.
- JIANG, Y. X.; NOMBELA, G.; MUÑIZ, M. Analysis by DC-EPG of the resistance to *Bemisia tabaci* on Mi-tomato line. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 99, p. 295-302, 2001.
- JIANG, Y. X.; WALKER, G. P. Electrical penetration graphs of the nymphal stage of *Bemisia argentifolii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 109, p. 101-111, 2003.
- JIN, S.; CHEN, Z. M.; BACKUS, E. A.; SUN, X. L.; XIAO, B. Characterization of EPG waveforms for the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), on tea plants and their correlation with stylet activities. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 1235-1244, 2012.
- JOOST, P. H.; BACKUS, E. A.; MORGAN, D.; YAN, F. Correlation of stylet activities by the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata* (Say), with electrical penetration graph (EPG) waveforms. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 327-337, 2006.
- KAMMINGA, K. L.; DAVIS, J. A.; STOCK, S. P.; RICHTER, A. R. First report of a mermithid nematode infecting *Piezodorus guildinii* and *Acrosternum hilare* (Hemiptera: Pentatomidae) in the United States. **Florida Entomologist**, v. 95, p. 214-217, 2012.
- KIMMINS, E. M.; TJALLINGII, E. F. Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 39, p. 135-141, 1985.
- KINDT, F.; JOOSTEN, N. N.; PETERS, D.; TJALLINGII, W. F. Characterization of the feeding behaviour of western flower thrips in terms of electrical penetration graph (EPG) waveforms. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 183-191, 2003.
- KINDT, F.; JOOSTEN, N. N.; PETERS, D.; TJALLINGII, W. F. Electrical penetration graphs of thrips revised: Combining DC-and AC-EPG signals. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 1-10, 2006.
- KOCH, R. L.; RICH, W. A.; PAHS, T. Statewide and season-long surveys for Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera) of Minnesota wheat. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 396-404, 2016.
- KRUGNER, R.; BACKUS, E. A. Plant water stress effects on stylet probing behaviors of *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) associated with acquisition and inoculation of the bacterium *Xylella fastidiosa*. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 66-74, 2014.
- LARGE, E. C. Growth stages in cereals. Illustration of the Feekes scale. **Plant Pathology**, v. 3, p. 128-129, 1954.
- LEE, D. H.; WRIGHT, S. E.; BOITEAU, G.; VINCENT, C.; LESKEY, T. C. Effectiveness of glues for harmonic radar tag attachment on *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) and their impact on adult survivorship and mobility. **Environmental Entomology**, v. 42, p. 515-523, 2013.
- LEI, H.; TJALLINGII, W. F.; VAN LENTEREN, J. C.; XU, R. M. Stylet penetration by larvae of the greenhouse whitefly on cucumber. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 79, p. 77-84, 1996.
- LEI, H.; TJALLINGII, W. F.; VAN LENTEREN, J. C. Probing and feeding characteristics of the greenhouse whitefly in association with host-plant acceptance and whitefly strains. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 88, p. 73-80, 1998.
- LEI, H.; VAN LENTEREN, J. C.; TJALLINGII, W. F. Analysis of resistance in tomato and sweet pepper against the greenhouse whitefly using electrically monitored and visually observed probing and feeding behaviour. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, p. 299-309, 1999.
- LIU, X. D.; ZHAI, B. P.; ZHANG, X. X.; ZONG, M. J. Impact of transgenic cotton plants on a non-target pest, *Aphis gossypii* Glover. **Ecological Entomology**, v. 30, p. 307-315, 2005.
- LUCINI, T.; PANIZZI, A. R. Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa meditabunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring pentatomids for EPG. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, p. 118-132, 2016.

- LUCINI, T.; PANIZZ, A. R. Feeding behavior of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Heteroptera: Pentatomidae) on maize seedlings: An EPG analysis of multiple input impedances and histology correlation. **Annals of the Entomological Society of America** v. 110, *in press*, 2017.
- LUCINI, T.; PANIZZ, A. R.; BACKUS, E. A. Characterization of an EPG waveform library for redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), on soybean plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, p. 198-210, 2016.
- LUO, X.; YEN, A. L.; POWELL, K. S.; WU, F.; WANG, Y.; ZENG, L.; YANG, Y.; CEN, Y. Feeding behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its acquisition of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', on huanglongbing-infected *Citrus reticulata* leaves of several maturity stages. **Florida Entomologist**, v. 98, p. 186-192, 2015.
- MANFREDI-COIMBRA, S.; SILVA, J. J.; CHOCOROSQUI, V. R.; PANIZZ, A. R. Danos do percevejo barriga-verde *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) em trigo. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1243-1247, 2005.
- MARCHETTI, E.; CIVOLANI, S.; LEIS, M.; CHICCA, M.; TJALLINGII, W. F.; PASQUALINI, E.; BARONIO, P. Tissue location of resistance in apple to the rosy apple aphid established by electrical penetration graphs. **Bulletin of insectology**, v. 62, p. 203-208, 2009.
- MARTÍN, B.; COLLAR, J. L.; TJALLINGII, W. F.; FERERES, A. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2701-2705, 1997.
- MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, v. 202, p. 1358-1359, 1964.
- MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. Identification of electrically recorded curve patterns associated with aphid feeding and salivation. **Nature**, v. 205, p. 1130-1131, 1965.
- MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. Probing behavior of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. I. Definitive correlation of electronically recorded waveforms with aphid probing activities. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 60, p. 400-405, 1967.
- MILES, P. W. Interaction of plant phenols and salivary phenolases in the relationship between plants and Hemiptera. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 12, p. 736-744, 1969.
- MILES, P. W. The saliva of Hemiptera. **Advances in Insect Physiology**, v. 9, p. 183-255, 1972.
- MILES, P. W. TAYLOR, G. S. "Osmotic pump" feeding by coreids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 73, p. 166-173, 1994.
- MIRANDA, M. P.; FERERES, A.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of *Bucephalogonia xanthophis*, a vector of *Xylella fastidiosa* in citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 35-46, 2009.
- MORAES, J. C.; GOUSSAIN, M. M.; VILELA, M.; PRADO, E. Comportamento de prova do pulgão-verde *Schizaphis graminum* (Rond.) (Hemiptera: Aphididae) em plantas de trigo tratadas com silício e dimetoato. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 83-90, 2013.
- MORENO, A.; PALACIOS, I.; BLANC, S.; FERERES, A. Intracellular salivation is the mechanism involved in the inoculation of Cauliflower mosaic virus by its major vectors, *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, p. 763-769, 2005.
- PALUMBO, J. C.; NATWICK, E. T. The Bagrada bug (Hemiptera: Pentatomidae): A new invasive pest of cole crops in Arizona and California. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2010-0621-01-BR, 2010.
- PERRING, T. M.; REED, D. A.; PALUMBO, J. C.; GRASSWITZ, T.; BUNDY, C. S.; JONES, W.; ROYER, T. United States Department of Agriculture – USDA, 2013. **National pest alert: bagrada bug *Bagrada hilaris* (Burmeister) Family Pentatomidae**. 2013. Disponível em: <<http://www.ncipmc.org/alerts/bagrabadbug.pdf>>. Acesso em: 10 jan 2016.
- PANIZZ, A. R. Growing problems with stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): species invasive to the U.S. and potential Neotropical invaders. **American Entomologist**, v. 61, p. 223-233, 2015.
- PANIZZ, A. R. Nutritional ecology of plant feeding arthropods and IPM, pp. 170-222. In: KOGAN, M.; JEPSON, P. (Eds.). **Perspectives in ecological theory and integrated pest management**. Cambridge University Press, 590 p, 2007.
- PANIZZ, A. R. Suboptimal nutrition and feeding behavior of hemipterans on less preferred plant food sources. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 1-12, 2000.
- PANIZZ, A. R.; AGOSTINETTO, A.; LUCINI, T.; PEREIRA, P. R. V. S. Effect of green-belly stink bug, *Dichelops furcatus* (F.) on wheat yield and development. **Crop Protection**, v. 79, p. 20-25, 2016.
- PANIZZ, A. R.; AGOSTINETTO, A.; LUCINI, T.; SMANIOTTO, L. S.; PEREIRA, P. R. V. S. **Manejo integrado dos percevejos barriga-verde, *Dichelops* spp. em trigo**. Embrapa Trigo, Série Documentos 114, 40 p, 2015.
- PANIZZ, A. R.; CORRÊA, B. S.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B.; NEWMAN, G. G.; TURNIPSEED, S. G. **Insects of Soybean in Brazil**. Embrapa Soja, Boletim Técnico 1, 1977.
- PANIZZ, A. R.; MCPHERSON, J. E.; JAMES, D. G.; JAVAHERY, M.; MCPHERSON, R. M. Economic importance of stink bugs (Pentatomidae), pp. 421- 474. In: SCHAEFER, C. W.; PANIZZ, A. R. (Eds.). **Heteroptera of Economic Importance**. Boca Raton, CRC Press, 828 p, 2000.
- PANIZZ, A. R.; NIVA C. C.; HIROSE, E. Feeding preference by stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) for seeds within soybean pods. **Journal of Entomological Science**, v. 30, p. 333-341, 1995.
- PANIZZ, A. R.; SILVA, F. A. C. Seed-sucking bugs (Heteroptera), pp. 295-324. In: PANIZZ, A. R., PARRA, J. R. P. (Eds.). **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Embrapa, CRC Press, 750 p, 2012.

- PANIZZ, A. R.; SLANSKY JR, F. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. **Florida Entomologist**, v. 68, p. 184-214, 1985a.
- PANIZZ, A. R.; SLANSKY JR, F. Legume host impact on performance of adult *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, v. 14, p. 237-242, 1985b.
- PANIZZ, A. R.; SMITH, J. G. Biology of *Piezodorus guildinii*: Oviposition, development time, adult sex ratio and longevity. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 70, p. 35-39, 1977.
- PEARSON, C. C.; BACKUS, E. A.; SHUGART, H. J.; MUNYANEZA, J. E. Characterization and correlation of EPG waveforms of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioizidae): variability in waveform appearance in relation to applied signal. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, p. 650-666, 2014.
- PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R.; LAU, D.; MARSARO JR, A. L.; PANIZZ, A. R. **Trigo: Manejo Integrado de Pragas**. Embrapa Trigo, Documento Número 113, 2013.
- PEREIRA, R. R. C.; MORAES, J. C.; PRADO, E.; DACOSTA, R. R. Resistance inducing agents on the biology and probing behaviour of the greenbug in wheat. **Scientia Agricola**, v. 67, p. 430-434, 2010.
- PHILIPPI, J.; SCHLIEPHAKE, E.; JÜRGENS, H. U.; JANSEN, G.; ORDON, F. Feeding behavior of aphids on narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*) genotypes varying in the content of quinolizidine alkaloids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 156, p. 37-51, 2015.
- POMPON, J.; QUIRING, D.; GIORDANENGO, P.; PELLETIER, Y. Role of xylem consumption on osmoregulation in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 610-615, 2010.
- POMPON, J.; QUIRING, D.; GIORDANENGO, P.; PELLETIER, Y. A phloem-sap feeder mixes phloem and xylem sap to regulate osmotic potential. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 1317-1322, 2011.
- POINTEAU, S.; JAGUENET, E.; COUTY, A.; DUBOIS, F.; RAMBAUD, C.; AMELINE, A. Differential performance and behavior of the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*, on three species of the biomass crop miscanthus. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 135-141, 2014.
- POWELL, G.; HARDIE, J. Xylem ingestion by winged aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 104, p. 103-108, 2002.
- PRADO, E.; TJALLINGII, W. F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 72, p. 157-165, 1994.
- RAMÍREZ, C. C.; NIEMEYER, H. M. The influence of previous experience and starvation on aphid feeding behavior. **Journal of Insect Behavior**, v. 13, p. 699-709, 2000.
- RANGASAMY, M.; MCAUSLANE, H. J.; BACKUS, E. A.; CHERRY, R. H. Differential probing behavior of *Blissus insularis* (Hemiptera: Blissidae) on resistant and susceptible St. Augustine grasses. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, p. 780-788, 2015.
- REED, D. A.; MAY, C.; LEWIS, T.; PERRING, T. M. Effects of temperature and host plant on development, fecundity and longevity of the stink bug, *Bagrada hilaris*. 59th Annual Meeting of the Entomological Society of America, 13-16 November 2011, NV, 2011.
- REED, D. A.; PALUMBO, J. C.; PERRING, T. M.; MAY, C. *Bagrada hilaris* (Hemiptera: Pentatomidae), an invasive stink bug attacking cole crops in the southwestern United States. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 4, p. C1-C7, 2013.
- RITCHIE, S.; HANWAY, J. J. **How a maize plant develops**. Iowa, Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, Ames (Special Report n. 48), 1989.
- RIZZO, H. F. E. Aspectos morfológicos y biológicos de *Edessa meditabunda* (F.). **Revista Peruana de Entomologia**, v. 14, p. 272-281, 1971.
- RIZZO, H. F. E. **Hemípteros de interés agrícola**. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 69 p, 1976.
- ROZA-GOMES, M. F.; SALVADORI, J. R.; PEREIRA, P. R. S. V.; PANIZZ, A. R. Injuries of four species of stink bugs to corn seedlings. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1115-1119, 2011.
- SALVADORI-RECATALÀ, V.; TJALLINGII, W. F.; FARMER, E. E. Real time, *in vivo* intracellular recordings of caterpillar-induced depolarization waves in sieve elements using aphid electrodes. **New Phytologist**, v. 203, p. 674-684, 2014.
- SANDANAYAKA, W. R. M.; BACKUS, E. A. Quantitative comparison of stylet penetration behaviors of glassy-winged sharpshooter on selected hosts. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, p. 1183-1197, 2008.
- SANDANAYAKA, W. R. M.; JIA, Y.; CHARLES, J. G. EPG technique as a tool to reveal host plant acceptance by xylem sap-feeding insects. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, p. 519-529, 2013.
- SANDANAYAKA, W. R. M.; MORENO, A.; TOOMAN, L. K.; PAGE-WEIR, N. E. M.; FERERES, A. Stylet penetration activities linked to the acquisition and inoculation of *Candidatus Liberibacter solanacearum* by its vector tomato potato psyllid. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 151, p. 170-181, 2014.
- SAXENA, K. N. Mode of ingestion in a heteropterous insect *Dysdercus koenigii* (F.) (Pyrrhocoridae). **Journal of Insect Physiology**, v. 9, p. 47-71, 1963.
- SCHUH, R. T.; SLATER, J. A. **True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Classification and natural history**. Cornell University Press, Ithaca, 336 p, 1995.
- SERIKAWA, R. H.; BACKUS, E. A.; ROGERS, M. E. Effects of soil-applied imidacloprid on asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) feeding behavior. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 1492-1502, 2012.
- SEO, B. Y.; JUNG, J. K.; PARK, C. G.; LEE, S. G.; PARK, Y. L. Plant penetration activities by the flatid planthopper *Metcalfa pruinosa* (Hemiptera: Fulgoroidea): an electrical penetration graph-histology analysis. **Journal of Applied Entomology**, v. 140, p. 706-714, 2016.

- SEO, B. Y.; KNOW, Y. H.; JUNG, J. K.; KIM, G. H. Electrical penetration graphic waveforms in relation to the actual positions of the stylet tips of *Nilaparvata lugens* in rice tissue. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 12, p. 89-95, 2009.
- SHACKEL, K. A.; CELORIO-MANCERA, M. P.; AHMADI, H.; GREVE, L. C.; TEUBER, L. R.; BACKUS, E. A.; LABAVITCH, E. A. Micro-injection of *Lygus* salivary gland proteins to simulate feeding damage in alfalfa and cotton flowers. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 58, p. 69-83, 2005.
- SILVA, F. A. C.; SILVA, J. J.; DEPIERI, R. A.; PANIZZI, A. R. Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa mediatubunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 386-390, 2012.
- SILVA, J. J.; VENTURA, M. U.; SILVA, F. A. C.; PANIZZI, A. R. Population dynamics of *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) on host plants. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 141-145, 2013.
- SLANSKY JR, F.; SCRIBER, J. M. Food consumption and utilization, pp. 87-163. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Eds.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford, Pergamon, v. 4, 849 p, 1985.
- SMANIOTTO, L. F.; PANIZZI, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the neotropics. **Florida Entomologist**, v. 98, p. 7-17, 2015.
- SPILLER, N. J.; KOENDERS, L.; TJALLINGII, W. F. Xylem ingestion by aphid - a strategy for maintaining water balance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 55, p. 101-104, 1990.
- SOSA-GOMEZ, D. R.; BOUCIAS, D.G.; NATION, J. L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, p. 31-39, 1997.
- STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P. Characterization and correlation of DC electrical penetration graph waveforms with feeding behavior of beet leafhopper, *Circulifer tenellus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 113-129, 2009.
- STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P.; CREAMER, R. Stylet penetration behavior resulting in inoculation of beet severe curly top virus by beet leafhopper, *Circulifer tenellus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 130-137, 2009.
- SUZUKI, Y.; HORI, M. Diurnal locomotion and feeding activities of two rice-ear bugs, *Trigonotylus caelestialium* and *Stenotus rubrovittatus* (Hemiptera: Heteroptera: Miridae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 49, p. 149-157, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates Inc., Publishers, Sunderland MA, 690 p, 2004.
- THOLT, G.; SAMU, F.; KISS, B. Feeding behaviour of a virus-vector leafhopper on host and non-host plants characterized by electrical penetration graphs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 155, p. 123-136, 2015.
- TJALLINGII, W. F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 24, p. 721-730, 1978.
- TJALLINGII, W. F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 177-186, 1985a.
- TJALLINGII, W. F. Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 38, p. 187-193, 1985b.
- TJALLINGII, W. F. Wire effects on aphids during electrical recording of stylet penetration. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 40, p. 89-98, 1986.
- TJALLINGII, W. F. Electrical recording of stylet penetration activities, pp. 95-108. In: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Eds.). **World crop pests: Aphids, their biology, natural enemies and control**. Amsterdam, Elsevier, v. 2B, 382 p, 1988.
- TJALLINGII, W. F. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 739-745, 2006.
- TJALLINGII, W. F.; GABRYS, B. Anomalous stylet punctures of phloem sieve elements by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 91, p. 97-103, 1999.
- TJALLINGII, W. F.; HOGEN ESCH, T. Fine structure of the stylet route in plant tissues by some aphids. **Physiological Entomology**, v. 18, p. 317-328, 1993.
- TRĘBICKI, P.; TJALLINGII, W. F.; HARDING, R. M.; RODONI, B. C.; POWELL, K. S. EPG monitoring of the probing behaviour of the common brown leafhopper *Orosius orientalis* on artificial diet and selected host plants. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 6, p. 405-415, 2012.
- VYAVHARE, S. S.; WAY, M. O.; MEDINA, R. F. Stink bug species composition and relative abundance of the redbanded stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean in the Upper Gulf Coast Texas. **Environmental Entomology**, v. 43, p. 1621-1627, 2014.
- XUE, K.; WANG, X. Y.; HUANG, C. H.; WANG, R. J.; LIU, B.; YAN, F. M.; XU, C. R. Stylet penetration behaviors of the cotton aphid *Aphis gossypii* on transgenic Bt cotton. **Insect Science**, v. 16, p. 137-146, 2009.
- WALKER, G. P. A beginner's guide to electronic monitoring of homopteran probing behavior, pp. 14-40. In: WALKER, G. P.; BACKUS, E. A. (Eds.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. Entomological Society of America, Lanham, Academic Press, 260 p, 2000.
- WAYADANDE, A. C.; NAULT, L. R. Leafhopper probing behavior associated with maize chlorotic dwarf virus transmission to maize. **Phytopathology**, v. 83, p. 522-526, 1993.
- YOUN, Y.; BACKUS, E. A.; SERIKAWA, R. H.; STELINSKI, L. L. Correlation of an electrical penetration graph waveform with walking by Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 94, p. 1084-1087, 2011.

ANEXOS

Artigos publicados, aceitos ou submetidos no período

- Lucini T**, Faria MV, Rohde C, Resende JTV, Oliveira JRF (2015) Acylsugar and the role of trichomes in tomato genotypes resistance to *Tetranychus urticae*. *Arthropod-Plant Interactions* 9: 45-53.
- Lucini T, Panizzi AR** (2016) Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa mediatubunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring pentatomids for EPG. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 158: 118-132.
- Lucini T, Panizzi AR**, Backus EA (2016) Characterization of an EPG waveform library for redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae), on soybean plants. *Annals of the Entomological Society of America* 109: 198-210.
- Lucini T, Panizzi AR** (2016) Three new host plants of *Edessa loxdalii* Westwood and notes on its rearing in the laboratory. *Florida Entomologist* 99: 139-141.
- Panizzi AR**, Agostinetto A, **Lucini T**, Pereira PRVS (2016) Effect of green-belly stink bug, *Dichelops furcatus* (F.) on wheat yield and development. *Crop Protection* 79: 20-25.
- Panizzi AR, Lucini T** (2016) What happened to *Nezara viridula* (L.) in the Americas? Possible reasons to explain the decrease in its population. *Neotropical Entomology* 45: 619-628.
- Lucini T**, Resende JTV, Oliveira JRF, Scabeni CJ, Zeist AR, Resende NCV (2016) Repellent effects of various cherry tomato accessions on the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Genetics and Molecular Research* 15: gmr7736. doi 10.4238/gmr.15017736.
- Lucini T, Panizzi AR** (2016) Field and laboratory biological observations on the uncommon *Cyrtocoris egeris* Packauskas & Schaefer (Pentatomidae: Cyrtocorinae). *Florida entomologist* 99: 818-821.
- Lucini T, Panizzi AR** (2017) Feeding behavior of the stink bug *Dichelops melacanthus* Dallas on corn seedlings: an EPG analysis at multiple input impedances and histology correlation. *Annals of the Entomological Society of America* (*in press*). doi: 10.1093/aesa/saw070.

Lucini T, Panizzi AR (2017) Behavioral comparisons of ingestion and excretion by selected species of pentatomids: evidence of feeding on different food sources supports pest status. *Neotropical Entomology* (*in press*). doi: 10.1007/s13744-016-0474-y

Panizzi AR, Webber NF, Lucini T (2017) Nymph and adult biology of *Euschistus cornutus* Dallas: a potential soybean pest in the neotropics. *Neotropical Entomology* (*in press*). doi: 10.1007/s13744-016-0467-x.

Lucini T, Panizzi AR (2017) Probing behavior of *Dichelops furcatus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) on wheat plants characterized by electropenetrography (EPG) and histological studies. *Journal of Insect Science* (aceito).

Panizzi AR, Lucini T (2017) Body position of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Dallas) during ingestion from stems of maize seedlings. *Neotropical Entomology* (submetido).

Outras publicações

Panizzi AR, Agostinetto A, Lucini T, Smaniotto LF, Pereira PRVS (2015) Manejo integrado dos percevejos barriga-verde, *Dichelops* spp. em trigo. Passo Fundo: Embrapa Trigo, (Boletim Técnico, 114).

Capítulo de livro

Panizzi AR, Lucini T (2017) Host Plant-Stinkbug (Pentatomidae) Relationships. pp. 30-57. In: **Stinkbugs: biorational control based on communication processes**. Cokl A, Borges M (eds). Boca Raton, CRC Press, 300 p.

Participação em eventos nacionais e internacionais

International Electropenetrography Conference and Workshop. Lake Alfred, EUA, 2016. (Apresentação oral).

XXV International Congress of Entomology (ICE). Orlando, EUA. 2016. (Apresentação oral – palestra).

XXVI Congresso Brasileiro de Entomologia / IX Congresso Latino-Americano de Entomologia (XXVI CBE / IX CLE). Maceió, Brasil, 2016. (Apresentação oral – palestra).

XI Mostra de Iniciação Científica e VIII Mostra de Pós-Graduação da Embrapa Trigo. Passo Fundo, Brasil, 2016. (Apresentação oral). Prêmio 3º colocado na categoria de Pós-Graduação.

63rd Annual Meeting of the Entomological Society of America. Minneapolis, EUA, 2015. (Apresentação em pôster).

X Mostra de Iniciação Científica e VII Mostra de Pós-graduação da Embrapa Trigo. Passo Fundo, Brasil, 2015. (Apresentação oral).

IX Mostra de Iniciação Científica e VI Mostra de Pós-graduação da Embrapa Trigo. Passo Fundo, Brasil, 2014. (Apresentação oral). Prêmio 1º colocado na categoria de Pós-Graduação.

Workshop Cooperação Brasil-Paraguai em Vírus e Vetores de Viroses em Cereais de Inverno. Embrapa Trigo, Passo Fundo, Brasil, 2014. (Ouvinte).

XXV Congresso Brasileiro de Entomologia. Goiânia, Brasil, 2014. (Apresentação oral – palestra).

Resumos publicados em anais de eventos

Lucini T, Panizzi AR (2016) Feeding behavior of neotropical pentatomids on soybean plants determined by EPG technique. In: 2016 International Electropenetrography Conference and Workshop, Lake Alfred, EUA.

Lucini T, Panizzi AR (2016) EPG (Electropenetrography) studies with neotropical pentatomids: Waveforms and feeding sites. In: XXV International Congress of Entomology (ICE 2016), Orlando, EUA.

Panizzi AR, Lucini T (2016) Stink bug sheath, saliva, and cell rupture feeding as cause of host injury. In: XXV International Congress of Entomology (ICE 2016), Orlando, EUA.

Tuelher E, **Lucini T**, Cervantes F, Backus EA (2016) Feeding behavior of the stink bug *Bagrada hilaris* is changed by the electrical signals applied during EPG recordings. In: XXV International Congress of Entomology (ICE 2016), Orlando, EUA.

Lucini T, Panizzi AR (2016) Superando o desafio de “aramizar” percevejos para os estudos com EPG (*Electrical Penetration Graph*) e relação de diferentes ondas eletromagnéticas com locais de alimentação. In: XXVI Congresso Brasileiro de Entomologia/ IX Congresso Latino-Americano de Entomologia (XXVI CBE/ IX

CLE), Maceió.

Panizzi AR, Lucini T (2016) Sítios de alimentação, bainhas alimentares e danos físico-químicos nos tecidos por percevejos fitófagos. In: XXVI Congresso Brasileiro de Entomologia/ IX Congresso Latino-Americano de Entomologia (XXVI CBE/ IX CLE), Maceió.

Lucini T, Panizzi AR (2016) Monitoramento eletrônico da alimentação do percevejo *Dichelops melacanthus* (Dallas) em plântulas de milho por meio da técnica de EPG. In: XI Mostra de Iniciação Científica e VIII Mostra de Pós-Graduação da Embrapa Trigo, Passo Fundo.

Lucini T, Panizzi AR, Backus EA (2015) Waveform characterization of the redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae), on soybean plant using the EPG. In: 63rd Annual Meeting of the Entomological Society of America, Minneapolis, EUA.

Panizzi AR, Lucini T (2015) Waveform characterization of the soybean stem feeder *Edessa mediotubunda* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): overcoming the challenge of wiring Pentatomids for EPG. In: 63rd Annual Meeting of the Entomological Society of America, Minneapolis, EUA.

Lucini T, Panizzi AR (2015) Alimentação do percevejo pentatomídeo *Piezodorus guildinii* (Westwood) em plantas de soja por meio do monitoramento elétrico. In: X Mostra de Iniciação Científica e VII Mostra de Pós-graduação da Embrapa Trigo.

Panizzi AR, Agostinetto A, Lucini T, Smaniotto LF, Pereira PRVS (2015) Níveis de ação para o controle do percevejo barriga-verde, *Dichelops furcatus* (F.) em trigo no RS. In: 9ª Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, Passo Fundo.

Smaniotto LF, **Lucini T, Panizzi AR** (2014) O uso do EPG (*Electrical Penetration Graph*) no monitoramento eletrônico da atividade alimentar de percevejos pentomídeos. In: XXV Congresso Brasileiro de Entomologia, Goiânia.

Lucini T, Panizzi AR (2014) Comportamento alimentar de percevejos pentatomídeos por meio do monitoramento eletrônico pelo uso do EPG. In: IX Mostra de Iniciação Científica e VI Mostra de Pós-graduação da Embrapa Trigo, Passo Fundo.